



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES: SCF Y SU RECEPTOR c-KIT,
ASOCIADOS CON LA FUNCIÓN DEL ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YANIRA FRANCO MURILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **FRANCO MURILLO YANIRA** con número de cuenta **92526655** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES: SCF Y SU RECEPTOR C-KIT, ASOCIADOS CON LA FUNCIÓN DEL ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS"**, realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de junio de 2015

M. del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM

A CONACyT, por la asignación de la beca 245153 y el apoyo al Proyecto 80338 y a UNAM por el apoyo al Proyecto PAPIIT IN21042012 y PAIP 6190-08.

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes, miembro comité tutor

A el Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, miembro comité tutor

Agradecimientos a título personal

Quiero dar un agradecimiento muy especial al Dr. Marco Cerbón por todo el apoyo dado a mi trabajo, por su entera disposición y guía durante la realización de mi trabajo doctoral y por su invaluable amistad.

Expreso un agradecimiento muy especial a toda mi familia quien con su apoyo incondicional, su confianza y amor me han acompañado en este camino para alcanzar esta meta académica tan importante y que me ha llenado de muchas experiencias que han enriquecido mi vida en todos los aspectos.

También quiero agradecer a esos amigos que en el camino me brindaron su amistad, su alegría y me compartieron su entusiasmo. Les deseo todo el éxito en sus caminos.

Este trabajo va dedicado a la amorosa presencia de mi Madre y a la memoria de mi Padre quienes me dieron el regalo más grande, la vida.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	
Endometriosis	5
Fisiopatología	
Teorías clásicas del origen de la endometriosis	7
Teorías actuales en la histogénesis de la endometriosis	8
Mecanismos celulares involucrados en la endometriosis	9
Proliferación y regulación en la endometriosis	
Apoptosis en el endometrio y la endometriosis	11
Vías de señalización, potenciales biomarcadores en la patogenesis de la endometriosis	14
Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STATs)	14
Los factores de transcripción SMAD	15
Factor de transcripción NF- κ B	15
La vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno	15
PKB/AKT y Endometriosis	16
Stem Cell Factor (SCF)/receptor c-Kit en el endometrio y en la endometriosis	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	
Pacientes y obtención de biopsias	23
Inmunohistoquímica	24
Inmunofluorescencia	25
Análisis Estadístico	26

RESULTADOS	
Expresión de Ki67, SCF y del receptor c-Kit	28
Expresión de Akt, p-Akt, GSK3 β y p-GSK3 β	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	38
PERSPECTIVAS	39
LITERATURA CITADA	40
APÉNDICE: ARTÍCULO REQUISITO	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización anatómica de los sitios probables de implantación de las células del endometrio y la generación de focos endometriósicos	6
Figura 2. Teorías propuestas en la patogénesis de la endometriosis	10
Figura 3. Predisposiciones moleculares para el desarrollo de la endometriosis	13
Figura 4. Arquitectura histológica de grupo control y endometrio eutópico con endometriosis	27
Figura 5. Expresión de Ki67, SCF, y c-Kit en el endometrio control y el endometrio eutópico con endometriosis	30
Figura 6. La expresión de Akt y pAkt (S473) en el control y el endometrio eutópico con endometriosis	33
Figura 7. Expresión de GSK3 β y pGSK3 β (S9) en el grupo control y el endometrio eutópico con endometriosis	34

Resumen

La endometriosis es un trastorno crónico y se caracteriza por la presencia de tejido endometrial en forma anormal fuera del útero o llamado también endometrio ectópico. Esta enfermedad tiene una alta prevalencia en las mujeres en edad reproductiva y en función al sitio de implantación se identifica como endometriosis pélvica, ovárica y profunda infiltrante. Los síntomas más comunes son el dolor pélvico, la dismenorrea, la dispareunia y la infertilidad, conduciendo a la reducción en la calidad de vida de la paciente. La etiología de la enfermedad sigue siendo desconocida. Sin embargo, los investigadores expertos en esta área han propuestos varias teorías para tratar de explicar el origen y establecimiento de la endometriosis que incluyen a la menstruación retrógrada e implantación de sitio ectópicos, a la de metaplasia del epitelio celómico y la teoría de la inducción, identificación de población celular de tipo troncal/progenitor, entre otras. Aunado a los recientes avances en investigación se examinan otros factores de riesgo que pueden estar implicados potencialmente en la formación de la endometriosis, incluyendo a la genética, factores inmunológicos, factores inflamatorios, modificación de la función del endometrio eutópico y especificidad de toxinas del medio ambiente. Asociados a estos factores, se han propuesto diferentes mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en la función de los implantes ectópicos característicos de la endometriosis así como de las mismas funciones en el endometrio eutópico quien ha sido considerado un factor muy importante del cual derivan o se desprenden células de endometrio que pueden proliferar, implantarse, promover angiogénesis y con una alta capacidad de escape a la vigilancia inmune.

Las funciones biológicas del endometrio ampliamente estudiadas, se refieren a la proliferación y la apoptosis, la adhesión e invasión, la angiogénesis y fallas en la actividad inmune. Asociados a éstas, se han considerado varias vías señalización que involucran a diferentes proteínas y factores de transcripción relacionados con las alteraciones de las respuestas celulares en sitios ectópicos así como en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, por ejemplo, las proteínas STAT, SMAD y MAPK. Recientemente, la

participación de la proteína cinasa B o Akt, también ha sido descrita en las funciones del endometrio así como en la endometriosis, esta proteína cinasa esta involucrada en la modulación del crecimiento, supervivencia, proliferación, y metabolismo celulares a través de la activación de sustratos blanco como mTOR, GSK3 α/β , FOXOs, Bad, IKKa, p21Cipl. Akt se localiza en el citoplasma en su forma inactiva y es reclutada a la membrana plasmática tras la fosforilación en la posición 3 del anillo inositol de fosfoinosítidos por la fosfoinositido-3-cinasa (PI3K). Esta vía de señalización puede ser activada por receptores tipo tirosina cinasa, como el receptor c-Kit que es activado por su ligando stem cell factor (SCF).

Nuestro objetivo fue investigar si SCF y su receptor c-Kit, un oncogene, sobre la función del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis. Para este estudio se obtuvieron biopsias de 35 mujeres con endometriosis y 25 mujeres eumenorreicas fértiles. Se analizó la expresión *in situ* de SCF/c-Kit, Ki67, de la proteína serina/treonina cinasa (Akt), la proteína Akt fosforilada (pAkt), la cinasa glucógeno sintasa 3 beta (GSK3 β) y su producto fosforilado (pGSK3 β), a través de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejido eutópico endometrial durante las fases proliferativa y secretora. Resultados: La expresión de Ki67 y SCF fue mayor en endometriosis que en los tejidos del grupo control (P <0,05) y mayor en la fase secretora en lugar de la fase proliferativa (P <0,01) del endometrio en la endometriosis. La expresión de c-Kit también fue mayor en la endometriosis aunque similar en ambas fases. La expresión de Akt y GSK3 β fue idéntico en todas las muestras y entre las fases del ciclo menstrual, mientras que pAkt y pGSK3 β , resultados opuestos al grupo control, se mantuvo sobreexpresada en la fase secretora en la endometriosis. Conclusión: La incesante proliferación celular en la fase secretora del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis está vinculada a la desregulación de la vía de señalización de Akt/GSK3 β promovida por SCF y la activación del receptor c-Kit.

Abstract

Endometriosis is a chronic condition and is characterized by the presence of endometrial tissue abnormally found outside the uterus. It is also called ectopic endometrium. This disease is highly prevalent in women of reproductive age and according to the site of ectopic implantation it is identified as pelvic, ovarian and deep infiltrating endometriosis. The most common symptoms are pelvic pain, dysmenorrhea, dyspareunia, and infertility, leading to disruption and reduced quality of life of the patient. The etiology of the disease remains unknown. However, expert researchers in this area have proposed several theories to explain the origin and development of endometriosis that include retrograde menstruation and implantation of ectopic site, the coelomic metaplasia of the epithelium and the theory of induction, identification cell population of stem/progenitor type, among others. The recent advances in research include other risk factors that may potentially be involved in the formation of endometriosis, such as genetics, immunological factors, inflammatory factors, changes in the function of eutopic endometrium, and specificity of toxins from the environment. In relation to these factors, there are hypotheses regarding different molecular mechanisms that may be involved in the function of the characteristic ectopic endometriosis implants and the same functions in the eutopic endometrium, which has been considered a very important factor from which endometrial cells —that can proliferate, implant, promote angiogenesis, and a high ability to escape immune surveillance— derive or peel.

Extensively studied biological functions refer to the proliferation and apoptosis, adhesion and invasion, angiogenesis, and immune activity failures. In relation to them, we considered several signaling pathways involving different protein and transcription factors associated with alterations in cellular responses and ectopic sites in eutopic endometrium of women with endometriosis, for example, STAT proteins, SMAD and MAPK. Recently, the involvement of protein kinase B or Akt, also described in the functions of the endometrium as well as endometriosis, this protein kinase is involved in modulating the growth, survival, proliferation and cell metabolism through the activation of key substrates, like

mTOR, GSK3 α/β , FOXOs, Bad, IKK α , p21Cipl. Akt is located in the cytoplasm in its inactive form and is recruited to the plasma membrane following phosphorylation in the 3 position of the inositol ring of phosphoinositides by the phosphoinositide 3-kinase (PI3K). This signaling pathway by receptors type tyrosine kinase can be activated, as the c-kit receptor and activated by its ligand SCF.

Our objective was to investigate the role of SCF and its receptor proto-oncogene c-kit on the role of eutopic endometrium of patients with endometriosis. For this study, biopsies from 35 women with endometriosis and 25 fertile eumenorrheic women were obtained. The expression of SCF / c-Kit, Ki67, protein serine / threonine kinase (Akt) protein phosphorylated Akt (pAkt), glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), and phosphorylated product (pGSK3 β) was analyzed through immunohistochemistry and immunofluorescence in eutopic endometrial tissue during the proliferative and secretory phases.

Results: SCF and Ki67 expression was higher in endometriosis than in tissues of control group (P <0.05) and higher in the secretory phase instead of the proliferative phase (P <0.01) from patients with endometrial endometriosis. The c-kit expression was also higher in endometriosis compared to normal women although similar in both phases. The expression of Akt and GSK3 β was similar in all samples and between the phases of the menstrual cycle, while pAkt and pGSK3 β , presented differences with the control group, its expression remained increased in the secretory phase in samples from patients with endometriosis.

Conclusion: The increased Ki67 proliferation marker during the secretory phase of the eutopic endometrium of women with endometriosis and deregulation of the Akt/GSK3 β signaling pathway associated with the significant increase of SCF and the activation of c-Kit receptor suggests participation in deregulated proliferation of endometrium in patients with endometriosis.

Introducción

Endometriosis

Es un trastorno ginecológico benigno que se define como la presencia y proliferación de tejido endometrial, estroma y glándulas, fuera de cavidad uterina (endometrio ectópico) principalmente en el peritoneo pélvico pero que puede localizarse sobre los ovarios, el septum rectovaginal, el uréter y rara vez en la vejiga, el pericardio y la pleura, entre otros (Figura 1; Guidice, 2004; Comiter, 2002), este tejido ectópico experimenta las mismas variaciones que el endometrio normal durante el ciclo menstrual y se desarrolla en el estadio estrogénico (Sharpe-Timms, 1997).

Los síntomas más comunes en las mujeres con endometriosis son la dismenorrea secundaria y progresiva, el dolor que usualmente comienza antes de la menstruación y continúa a través de los días que se presenta el flujo menstrual, acompañado por la dispareunia, la disuria o la disquecia. El dolor, también se ha referido a las regiones músculo-esqueléticas como la espalda baja. La intensidad del dolor esta principalmente influenciada por la localización y profundidad del implante endometriósico, por ejemplo los implantes profundos y con una extensa área inervada están consistentemente asociados al dolor. Se ha propuesto que la menstruación cíclica *in situ* en el sitio de una lesión endometriósica podría promover un nicho inflamatorio crónico, así como, la liberación de citocinas y la activación de las prostaglandinas que regulan la percepción del dolor, o la directa infiltración de células endometriósicas dentro de los nervios aferentes (Vercellini et al., 2003) y el aumento del ambiente inflamatorio podría provocar la sensibilización de los nociceptores y de las neuronas centrales (Latremoliere y Woolf, 2009).

La infertilidad asociada a la endometriosis es otra de las principales manifestaciones clínicas, ésta podría ser resultado de la distorsión en la relación anatómica de la pelvis provocada por la fibrosis y la formación de adhesiones asociadas a la liberación de diversas sustancias en el endometrio,

producidas por los implantes endometriósicos, las cuales podrían incluir prostaglandinas, citocinas y factores de crecimiento, así como factores embriotóxicos (Burns y Schenken, 1999).

La endometriosis presenta una prevalencia estimada entre el 10 al 15 % en mujeres en edad reproductiva, lo que la hace una patología dependiente de estrógenos (Olive y Pritts; 2001), su etiología y patogénesis son controversiales pero se creó que involucra múltiples procesos genéticos, endócrinos, inmunológicos, angiogénicos y ambientales (Bouquet, et al., 2014).

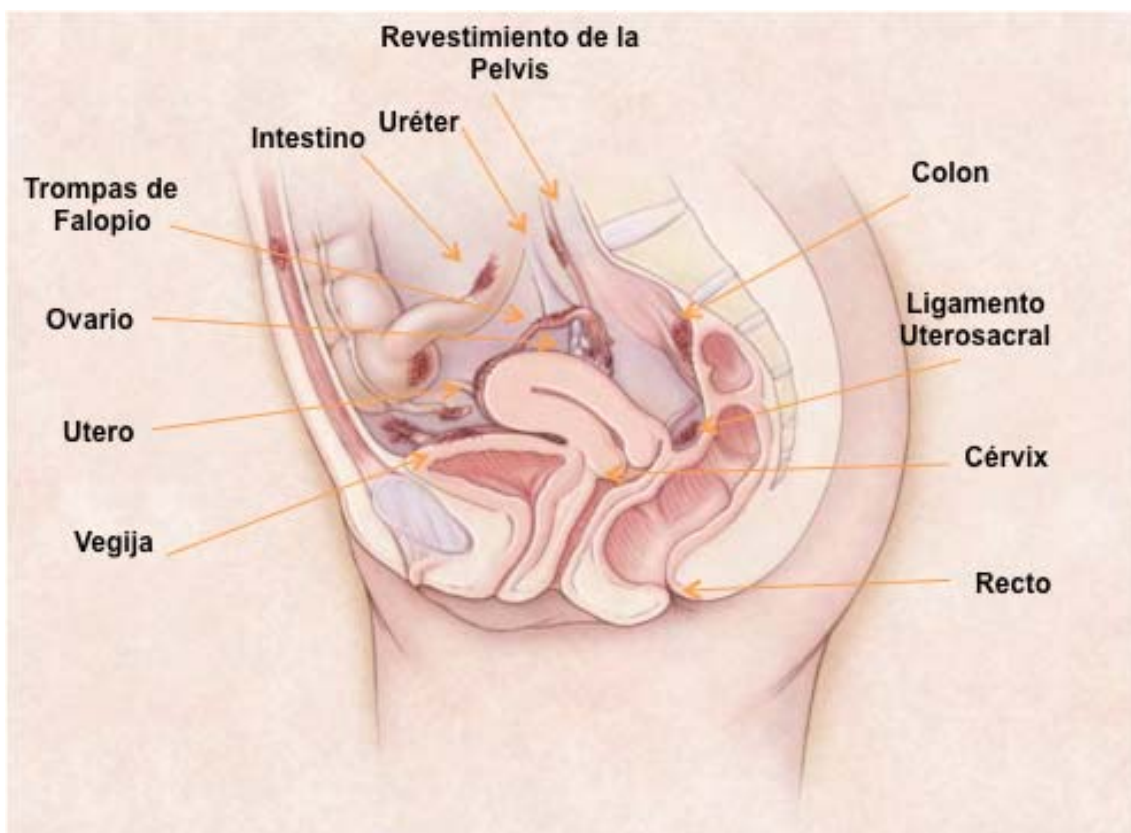


Figura 1. Localización anatómica de los sitios probables de implantación de las células del endometrio y la generación de focos endometriósicos. (Modificada de: Olive y Pritts, 2001).

Fisiopatología

Teorías clásicas del origen de la endometriosis

Una extensa investigación y diversas hipótesis han sido propuestas para explicar el origen de la endometriosis, las cuales incluyen: *la teoría de Sampson y la menstruación retrograda*; es decir, las células endometriales son transportadas y diseminadas a la cavidad peritoneal mediante flujo retrógrado a través de los tubos de falopio, pero también pueden implantarse en cualquier tejido de la zona abdomino-pélvica (Sampson, 1927). En estudios recientes se ha mostrado que el flujo menstrual contiene factores que alteran la morfología del mesotelio peritoneal; lo que puede crear zonas de adhesión endometrial (Velasco-Ruiz, 2002). Ésta se lleva a cabo gracias a inductores de adhesión molecular y sus receptores; citocinas y factores de crecimiento (IL-8, IL-1, TNF-alfa); factores de crecimiento endotelial; sobreexpresión de metaloproteínas y activadores de plasminógeno que garantizan destrucción local de la matriz extracelular (Van Langendonck, 2002).

Teoría de la metaplasia celómica o de Meyer, sugiere que el peritoneo parietal es un tejido pluripotencial, que posee la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de tejidos en que lo hizo en su etapa embrionaria. Tanto el ovario como el progenitor del endometrio, los ductos Mülllerianos, provienen del epitelio celómico, por lo que la metaplasia podría explicar el desarrollo de la endometriosis ovárica, así como al peritoneo, por su alto potencial de proliferación y diferenciación del mesotelio peritoneal. Los procesos metaplásicos aumentan con la edad, sin embargo la endometriosis se limita a la vida reproductiva, de modo que esta teoría, tomaría fuerza si se atribuye a una metaplasia inducida por estrógenos (Seli, 2003).

Teoría de la metastasis linfo-vascular. Evidencias importantes apoyan el origen de la endometriosis a partir de la propagación de tejido endometrial por una red linfática o vascular aberrantes (Ueki, 1991). La localización de focos endometriósicos en el perineo o la ingle, refuerzan esta teoría (Mitchell, 1991;

Pollack, 1990). La región retroperitoneal tiene abundante circulación linfática y en los casos en los que no se presenta una lesión peritoneal pero sin lesiones retroperitoneales sugiere que pudo generarse a través de la propagación linfática (Moore, 1988). Adicionalmente, la propagación del adenocarcinoma endometrial por la vía linfática indica una tendencia y facilidad de transporte del endometrio por esta misma ruta para el caso de la endometriosis (McMeekin, 2003). Sin embargo pocos son los estudios que evalúan experimentalmente esta transmisión de la endometriosis.

Teorías actuales en la histogénesis de la endometriosis

Otra de las teorías propuestas es *la teoría de la Inducción*, la cual propone como factores biológicos u hormonales pueden inducir la diferenciación o indiferenciación de las células dentro del tejido endometrial (Vinatier, 2001). Estos factores pueden ser exógenos o liberados directamente desde el endometrio (Bontis, 1997). En estudios *in vitro* se ha demostrado el potencial del epitelio ovárico, el cual se ha sometido a la transformación hacia lesiones endometriósicas ante el estímulo con estrógenos (Matsura, 1999).

Por otra parte, la reciente caracterización de *células stem/progenitoras* en el endometrio ofrecen una nueva dirección sobre el origen del tejido endometrial ectópico y los mecanismos involucrados en la patogénesis de la endometriosis (Li T, 2014). Al respecto, se ha preguntado si las células stem/progenitoras incrementarían su capacidad para implantarse y establecerse por sí mismas como tejido ectópico, o si las células stem normales se implantarían en un peritoneo anormal. Durante cada ciclo menstrual, el endometrio y los vasos sanguíneos experimentan un extenso crecimiento y proliferación (Gargett CE, 2010). Las células progenitoras tienen un papel crítico en la reposición y regeneración de tejidos dañados debido a su alto potencial de renovación (Hsu YC, 2014). Se ha hipotetizado que las células progenitoras adultas son responsables de la regeneración cíclica en la fase reproductiva de la mujer. En recientes investigaciones se ha demostrado como las células progenitoras residentes en la capa basal del endometrio pueden viajar durante la

menstruación a través de la trompa de Falopio a la cavidad peritoneal y pueden establecerse como implantes endometriósicos (Sasson y Taylor, 2008).

Por otro lado, se ha identificado la formación de clonas de glándulas endometriales a partir de células aisladas del endometrio en cultivo (Dimitrov, et al, 2008; Schwab, 2008), así como la identificación de marcadores tipo stem a nivel de expresión génica, incluyendo factores de transcripción asociados a pluripotencialidad, por ejemplo: Oct4, Nanog, KLF4 y Sox2 (Pacchiarotti, 2011; Park, 2011) y como marcadores de célula stem adulta; CD146, CD73, CD90, notch1 y Msil (Taylor, 2004). Adicionalmente, a través del análisis por microarreglos se ha demostrado que en el endometrio eutópico el perfil de expresión génica de pacientes con endometriosis difiere de las muestras control no afectadas (Masuda, 2010; Gargett, 2007; Wu, 2006). Estas evidencias sugieren que la presencia de implantes endometriósicos podrían alterar la expresión génica dentro del endometrio eutópico y en consecuencia la función del mismo. Si bien, se ha considerado e identificado varios factores involucrados en la endometriosis, la propensión para provocar esta patología en algunas mujeres pero no en otras, demuestra que esta enfermedad aun presenta etiología no identificada (Figura 2).

Mecanismos celulares en la endometriosis

La endometriosis esta considerada cómo un trastorno benigno, sin embargo se han descrito alteraciones en los mecanismos celulares y moleculares como la proliferación, la invasión, la función inmune y neo-angiogénesis (Bouquet De Jolinère, et al, 2014).

Proliferación y su regulación en la endometriosis

La interacción de estradiol (E2) y progesterona (P4) con sus respectivos receptores son los principales reguladores de los mecanismos de proliferación en el endometrio (Jiang QY y Wu RU, 2012). La cíclica regulación de la proliferación celular no esta presente en el tejido endometriósico la cual se caracteriza por alteraciones en las moléculas del ciclo celular como las ciclinas

(ciclina D1) y las cinasas dependientes de ciclinas, las cuales son hormono-dependientes (Pellegrini, et al., 2012).

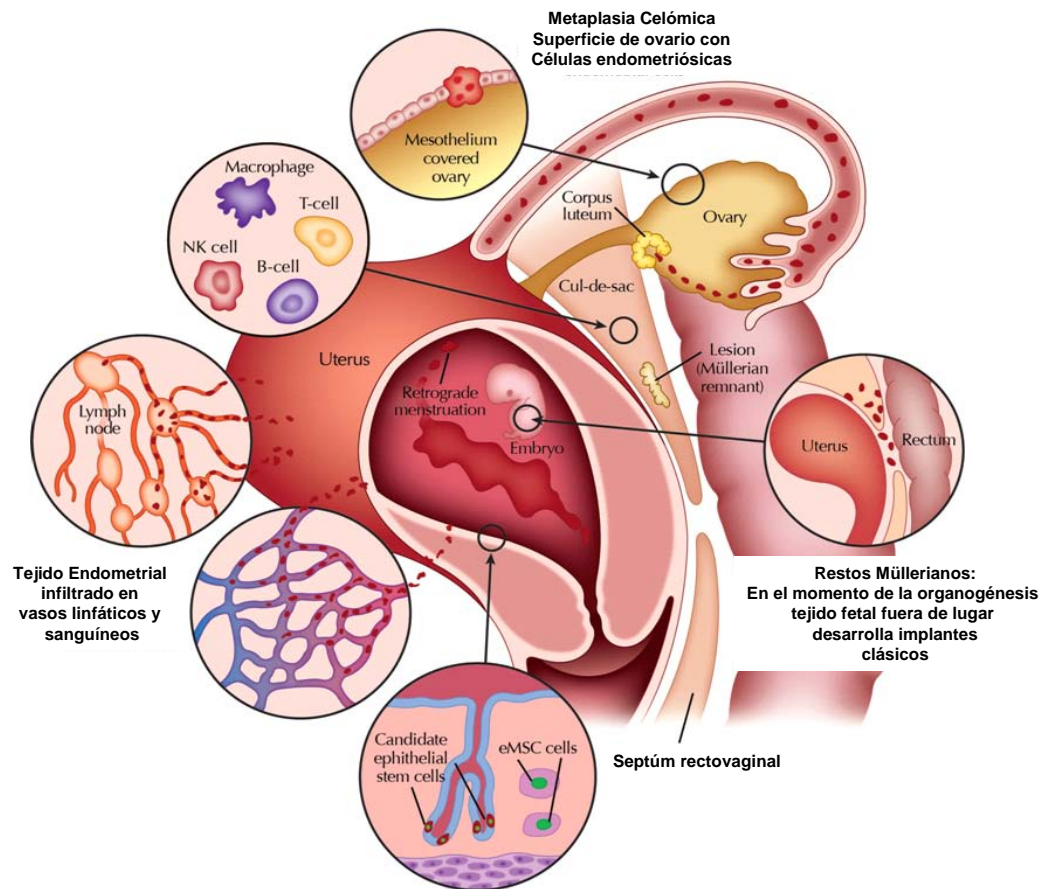


Figura 2. Teorías propuestas en la patogénesis de la endometriosis (Modificada de: Yanson Falcone, Obstet Gynecol 2011).

Por ejemplo, el factor de transcripción FOXO1A (Shazand, et al., 2004), involucrado en la apoptosis y ciclo celular, esta regulado por la P4y su expresión esta reducida significativamente en el tejido endometrial de mujeres con endometriosis, al igual que otro regulador proteico del ciclo celular ErbB-2 (TOB1), lo cual podría ser resultado del aumento de la interleucina-1 β (IL-1 β ; Schneider , et al., 1998). Además, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la disminución de su regulador negativo, el gene 6 mitógeno inducible (MIG6), contribuyen al crecimiento no mitigado de las células endometriósicas así como al estímulo de la proliferación de las células endometriósicas (Klemm, et al, 2007; Chegini, et al., 1992). Por otra parte, el sangrado recurrente que se observa de

manera característica en la endometriosis esta relacionado a la continua generación de trombina la cual subsecuentemente puede estimular la proliferación de las células endometriósicas a través de la activación de los receptores activados por proteasas (PAR1) y la subsecuente activación de sus proteínas blanco como la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP1), el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la $IL-1\beta$, la enzima cicloxigenasa 2 (COX-2), el factor de crecimiento hepático (HGF) y el factor tisular (TF; Jiang y Wu, 2012; Olivares, et al., 2008). Además, el aumento significativo en los niveles $TNF\alpha$, IL 's y HGF en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis podría contribuir a la proliferación de las células endometriósicas (Bergqvist, et al., 2001; Yoshida, et al., 2004).

Apoptosis en el endometrio humano y la endometriosis

La muerte celular programada o apoptosis, es un proceso fisiológico requerido para el balance en el crecimiento, diferenciación y renovación de muchos tejidos, en ella se involucra la ruptura selectiva internucleosomal de la cromatina, originando el englobamiento y reducción celulares (Kerr et al., 1972). En el endometrio humano, la apoptosis es particularmente importante debido a los ciclos de proliferación y recambio celulares, en donde la fragmentación característica del DNA ha sido ampliamente documentada (Tabibzadeh, 1996; Nasu et al., 2011). Durante este proceso, en el endometrio normal se lleva a cabo la eliminación de células disfuncionales o senescentes y se prepara el camino para la reparación tisular en cada ciclo menstrual. Las células apoptóticas predominan en el epitelio glandular pero también pueden ser encontradas en el estroma. El número de células apoptóticas en la capa funcional del endometrio normal incrementa en la fase secretora tardía y su máximo nivel se registra en la menstruación, seguido por la proliferación de nuevas células desde la capa basal en la siguiente fase proliferativa de cada ciclo (Vaskivuo, et al., 2000).

En el caso de la endometriosis las células del endometrio presentan resistencia a la apoptosis y a la regulación hormonal de esta. Diferentes evidencias *in vitro*

han demostrado que las células endometriósicas responden mas intensamente a los efectos anti-apoptóticos inducidos por los estrógenos. Por ejemplo, la proteína antiapoptótica, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK)1/2 esta altamente activada (fosforilada) en las células del endometrio glandular de tejido ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis a lo largo del ciclo menstrual (Murk et al., 2008). Por otra parte, los estrógenos estimulan la fosforilación de ERK1/2 en las células del estroma aisladas del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, pero no en las células estromales de mujeres sin enfermedad. Por otra parte, la resistencia a la P4 es uno de los mecanismos patogénicos asociados e involucrados en la supervivencia de los implantes endometriósicos. Los niveles de expresión del PR (mRNA), particularmente los transcritos que codifican a la isoforma B, están reducidos en las lesiones ectópicas extraováricas comparados con los niveles en el endometrio eutópico de las mismas pacientes efectos que han sido cuantificados por western blot demostrando cambios en la proteína (Attia et al., 200). A través del análisis inmunohistoquímico, se sugiere que los niveles de PR tienden a ser bajos y sin variación a través del ciclo menstrual en las lesiones peritoneales (Beliard et al., 2004). Además, el establecimiento de las lesiones endometriósicas en la pelvis son capaces de inducir resistencia de larga duración en el endometrio eutópico ante P4 (Al-Sabbagh et al., 2012; Fazleabas, 2010). El índice apoptótico en la fase secretora media del endometrio esta reducida en las mujeres con endometriosis (Szymanowski, 2007), lo que sugiere una respuesta subnormal a la P4, índice que se restablece después de que las pacientes son tratadas con una combinación de anticonceptivos orales (Meresman et al., 2002) o con un sistema intrauterino de liberación de levonorgestrel (Gomes et al. 2009).

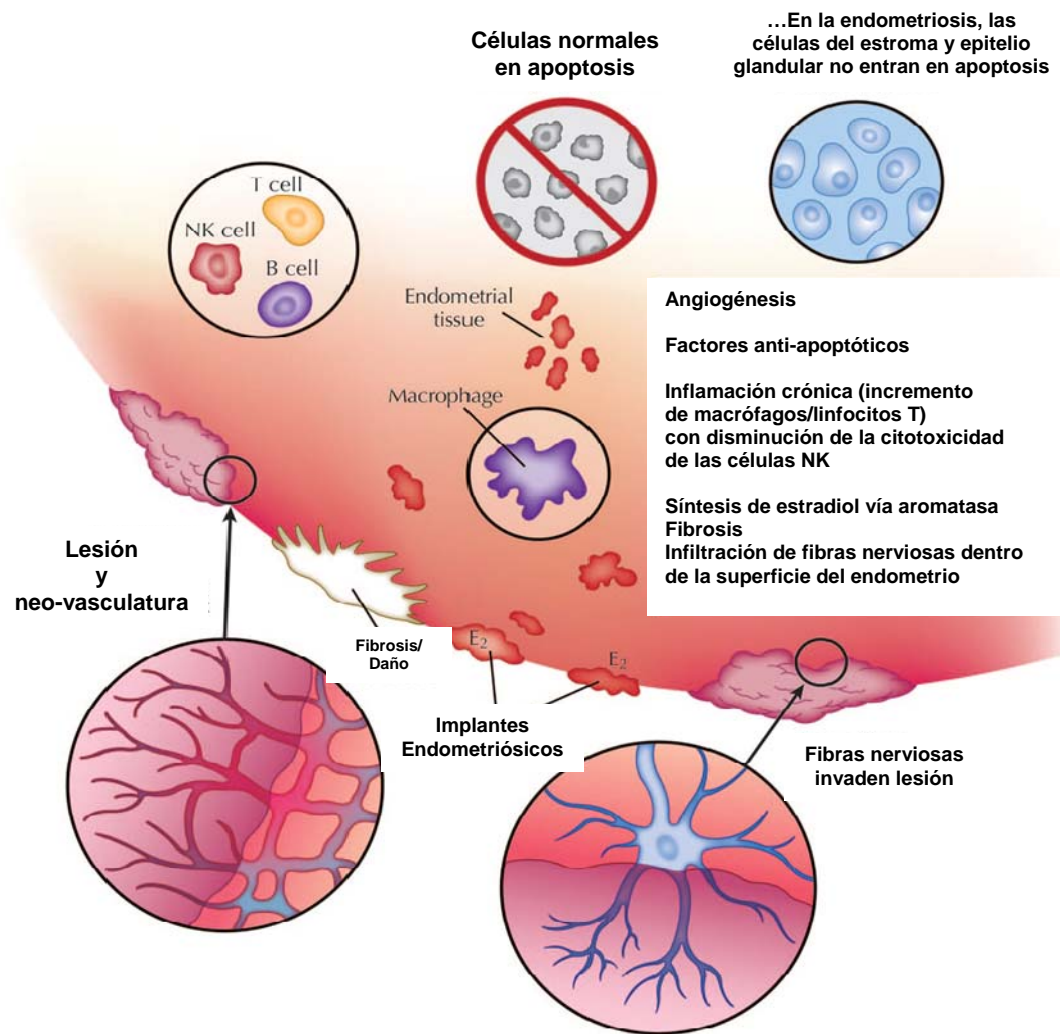


Figura 3. Predisposiciones moleculares para el desarrollo de la endometriosis (Modificada de Yanson Falcone. Obstet Gynecol 2011).

Vías de señalización, potenciales biomarcadores en la patogénesis de la endometriosis

El análisis de la información disponible del estudio del transcriptoma a través de diferentes datos derivados de microarreglos han permitido identificar las vías de señalización reguladas diferencialmente y que en este caso podrían estar involucradas con la patogénesis de la endometriosis, seguido de un segundo análisis que pudiera revelar a las proteínas, los péptidos o RNA mensajeros como útiles biomarcadores o potenciales agentes terapéuticos.

Al respecto, *las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT)*, forman un nodo central en la regulación de la mayoría de vías de señalización. La familia de STATs incluye siete factores de transcripción que residen en el citoplasma en forma inactiva. Los STATs se dividen en dos grupos de acuerdo a su función. El primero de ellos lo conforma, STAT-2, 4 y 6, los cuales son activados por citosinas y están involucrados en el desarrollo de células T y la señalización de IFN- γ (Calo V, et al., 2003). Los STATs-1, 3 y 5 son principalmente activados por factores de crecimiento como; EGF, PDGF, FGFR, IL-6, HGF y VEGF y regulan la proliferación y la apoptosis (Calo, et al., 2003). Los STATs median sus efectos a través de la transcripción de genes blanco y promueven la proliferación (CCND1 y c-Myc), la angiogénesis, la invasión y suprimen la apoptosis (Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 y survivina; Turkson y Jove, 2000). Por ejemplo, la activación constitutiva de STAT5 regula los complejos de ciclina D/CDK4-6 en el progreso de la fase G1 a S en el ciclo celular y de respuestas antiapoptica dada por Bcl-xL (Buettner et al., 2002). STAT3 regula a las ciclinas D1,2, 3 y A (cdc25A) y regula a la baja a p21 y p27 (Fukada, et al., 1998), además de activar factores pro-angiogénicos como VEGF (Niu G, et al., 2002).

En la endometriosis los mecanismos de proliferación, inhibición de la apoptosis, migración y angiogénesis son aspectos clave en el establecimiento de la patogénesis lo que hace factible que las proteínas STATs tengan un papel importante como reguladores de cada uno de estas respuestas.

Los *factores de transcripción SMAD* son otros reguladores que median las vías de señalización de los factores de crecimiento y propagan las señales intracelulares principalmente de TGF- β , quien es una cinasa serina-treonina que regula la proliferación celular a través de la fosforilación a los receptores de SMADs (R-SMADs) de tipo SMAD2 y SMAD3 (Masague, 1998). La activación de éstos, provoca la unión de SMAD4 y su translocación al núcleo y a su vez formar el complejo de activación transcripcional (Masague y Wotton, 2000). Las señales de proliferación bajo el control transcripcional de TGF- β y SMADs incluyen la activación de ciclina-D1, cinasa dependiente de ciclina 4, p21, p27, p15 y c-myc (Grady, 2005). TGF- β también regula proteínas a las pro-apoptóticas Bad y caspasa-3 (Meng, et al., 2013). Otro proceso que está influenciado por la secreción de TGF- β derivado del aumento de macrófagos en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis, es el compromiso de status inmune, en donde se puede inducir la expresión de otras proteínas como MCP-1, COX-2 y PGE2, provocando un respuesta inflamatoria crónica lo que podría contribuir a la patogénesis de la endometriosis (Malhotra N, et al., 2013).

Por otra parte, la activación constitutiva del factor NF- κ B, importante regulador de la respuesta inflamatoria, ha sido demostrada en células endometriósicas (Wieser et al., 2005), sugiriendo que este factor puede promover el crecimiento y supervivencia de estas lesiones ya que en presencia de inhibidores específicos se bloquea la proliferación de las células endometriósicas del estroma y se induce la apoptosis (González-Ramos et al., 2008).

La vía de señalización que involucra a *la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK)/cinasa regulada por señal extracelular (ERK)* o llamada también la vía MEK ha sido ampliamente estudiada. Esta vía regula las señales de proliferación, apoptosis, adhesión, invasión, angiogénesis y evasión de la vigilancia inmune (Chappell, et al., 2011). ERK controla la expresión transcripcional de c-myc y c-fos (Maurer, et al., 2011) y en citoplasma regula la familia de proteínas cinasas ribosomales S6 (RSK) quienes subsecuentemente regulan la progresión de el ciclo celular vía la expresión de p27 y de la

apoptosis vía inhibición de Bad (Roskoski, 2012). Con relación a la evasión de la vigilancia inmune se ha sugerido que promueve una regulación a la baja de los antígenos de superficie celular que podrían ser reconocidos por las células T (Liu y Lang, 2011). De tal manera que este regulador maestro de diversas vías de señalización ha sido considerado, en la endometriosis, como un blanco terapéutico.

PKB/AKT y Endometriosis

La familia de proteínas de Akt está constituida por tres diferentes isoformas; cada una de las cuales es producida por un gene específico. Las tres distintas isoformas son Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ ; cada una de estas isoformas presenta alta homología (> 85%) en su secuencia así como, funcional y estructuralmente (Fabi y Asselin, 2014). Akt es un efector clave de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y regulador pleiotrópico que regula múltiples procesos celulares como la evasión de la apoptosis, la diferenciación, supervivencia y proliferación celulares (Manning y Cantley, 2007; Hennessy et al., 2005). PI3K fosforila la posición 3 de los fosfolípidos fosfatidilinositol (PI), 4-fosfato fosfatidilinositol (PI(4)P) y 4,5-difosfato fosfatidilinositol (PI(4,5)P₂) para general PI(3)P, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃, respectivamente. Estos fosfolípidos son segundos mensajeros que regulan la actividad de Akt mediante la unión sobre el dominio PH (Pleckstrin Homology) y que le confiere propiedades de adhesión sobre la membrana plasmática (Lemmon, 2007). La interacción del dominio PH de Akt y PI(3,4)P₂ induce un cambio conformacional de la proteína dejando al descubierto residuos de treonina (Trh 308 para Akt, Trh 309 para Akt2 y Trh 305 para Akt3) que son fosforilados por PDK-1 (Raimondi y Falasca, 2011). La activación completa de Akt se lleva a cabo mediante una segunda fosforilación sobre residuos de serina (S473Akt1, S474Akt2 y S472Akt3) por la proteína PDK-2 (Yang et al., 2002).

En la endometriosis, la vía de Akt esta sobre activada debido al ambiente inflamatorio y hormonal de la enfermedad (Cinar et al., 2009; Eaton et al., 2013). Diversos estudios en útero de roedor han demostrado que Akt es un factor de supervivencia de las células endometriales (Tessier, et al., 2001; Dery

et al., 2003; Caron, et al., 2009). En las células del estroma endometrial humano, los niveles de Akt fosforilado disminuye el número de células decidualizadas (Yoshino, et al., 2003), así como del marcador de decidualización IGFBP1 (Lathi, et al., 2005). La rápida fosforilación de Akt en las células de el estroma endometrial promovida por E2 induce el incremento en la proliferación y la migración de estas células (Gentilini, et al., 2007). Uno de los posibles factores responsables de la alta fosforilación de Akt en las células endometriósicas podría estar relacionado a la local y continua estimulación del receptor de estrógenos debido a la producción intra-lesional de estradiol, como lo han sugerido otros estudios que demuestran aumento de la actividad y expresión de la aromatasa local (Bulun et al., 2012).

Estudios realizados en células derivadas de biopsias de endometrio y en células de epitelio endometrial (células Ishikawa) mostraron que el E2 aumenta significativamente la fosforilación de Akt, respuesta inhibida en presencia del inhibidor de la proteína PI3K, wortmanina (Ozlem, et al., 2004), sugiriendo que el E2 podría ejercer en parte su efectos proliferativos y antiapoptóticos de manera no genómica a través de la vía de señalización de Akt.

Sin embargo este regulador downstream, es activado por múltiples factores de crecimiento que se unen a sus receptores de tipo tirocina cinasa y subsecuentemente fosforila a la cinasa 3-fosfoinositido (PI3K). PKB/Akt fosforilado surge como una molécula clave de señalización a través de sus sustratos blanco como mTOR, GSK3 α/β , FOXOs, Bad, IKK α , p21Cipl, ER, entre otros (Lee y Kim, 2014) en diversos procesos fisiológicos como tumorigénesis, además que regula diversos procesos celulares como la apoptosis, supervivencia celular, el ciclo celular, angiogénesis y captura de glucosa (Scheid y Woodgett, 2001; Nicholson y Anderson, 2002). El análisis seriado de expresión génica (SAGE) reveló el incremento en los niveles de PI3K y Akt fosforilado (S473) en tejidos endometriósicos, probablemente a través del aumento en la expresión de GAS6, AXL y ACTN4, responsables del aumento de la proliferación y motilidad (Honda et al., 2008). Otros estudios resaltan la relación entre los altos niveles de Akt fosforilado y el incremento en

la expresión de survivina, sugiriendo que Akt permite la supervivencia celular y evita la apoptosis (Zhang et al., 2009).

En estudios recientes se ha demostrado una elevada expresión Akt1 en etapas tempranas de la endometriosis y una expresión moderada en etapas posteriores de la enfermedad, la expresión de Akt1 fue abrumadoramente localizada en el citoplasma de las células del estroma y del epitelio glandular y se asoció a la disminución de la infertilidad en las pacientes. (Laudanski, et al., 2009).

El papel de Akt en el establecimiento de lesiones ectópica ha sido demostrado a través de la inhibición dosis dependiente de Akt fosforilado (S743) en las células del estroma provenientes de endometriomas ováricos humanos, así como en las células del estroma de pacientes libres de la enfermedad en presencia del inhibidor alostérico MK-2206 (Ozlem et al., 2004). Por otra parte, también se observó la disminución del marcador de proliferación Ki-67, en los ratones tratados con el inhibidor, aunado al aumento en la expresión de los niveles de FOXO1 y del PR (Kim, et al, 2014).

Diversos estudios han investigado la apoptosis y la proliferación del endometrio ectópico endometriósico, aunque algunos estudios no revelan diferencias en los niveles de Ki67, en mujeres con o sin endometriosis (Mettler et al., 1997; Bourlev et al., 2005) otros estudios, sin embargo, si han encontrado un incremento de este marcador en las mujeres afectadas (Burlev et al., 2006; Johnson et al., 2005; Park et a., 2009). Se ha encontrado que el porcentaje de apoptosis en las células endometriales desprendidas, así como en el epitelio glandular de mujeres con endometriosis esta significativamente disminuido en las fases proliferativa y secretoria tardía, lo que sugiere pérdida de la variabilidad cíclica de la apoptosis. El incremento en la supervivencia y proliferación de las células que salen de la cavidad uterina podría estar asociado a la implantación de dichas células en otras superficies peritoneales e incluso en órganos abdominales (Dmowski et al., 2001).

En resumen, existen una serie de alteraciones celulares y moleculares ampliamente estudiadas en las lesiones endometriósicas, que correlacionan

con el crecimiento y la proliferación celular anormal en sitios ectópicos del endometrio.

Stem cell factor /receptor c-Kit en el endometrio y en la endometriosis

Las células epiteliales del endometrio normal y tejido ectópico endometriósico expresan marcadores tipo célula progenitora como oct-4 y c-Kit (Pacchiarotti, et al., 2011; Cho, et al., 2004). c-Kit es un proto-oncogene que codifica para la proteína receptor tipo tirocina cinasa (Roskoski R, 2005; Sharkey AM, et al, 1994), su ligando es la proteína SCF (stem cell factor) y son esenciales en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células que expresan c-Kit, como es el caso de las células progenitoras hematopoyéticas, mastocitos, melanocitos y en el endometrio normal (Göette et al 2011; Uzan et al., 2005; Yarden et al., 1987).

La identificación de mRNA de SCF y c-kit ha sido demostrada en el endometrio en las fases proliferativa y secretora, en tejido placentario y en trofoblastos sugiriendo una regulación en los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación (Kauma et al, 1996; Saito et al, 1994). La cuantificación de la proteína de SCF en el plasma seminal, en el suero humano (3.3 +/- 1.1 ng/ml; Langley et al, 1993) y en el fluido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis has sido determinada (Osuga et al, 2000). Adicionalmente, SCF y/o su receptor c-Kit han sido identificados en las células del estroma de tumores gastrointestinales (Lux et al., 2000), en adenocarcinoma endometrial (Elmore et al., 2001) así como en las lesiones endometriósicas peritoneales y ováricas (Uzan et al., 2005), sugiriendo que el eje SCF/c-Kit esta involucrado en la patogénesis de la endometriosis.

Por otra parte, se sabe que la regulación de la proliferación, la diferenciación y la migración, antes mencionadas, es llevada a cabo por la activación de al menos cuatro vías de señalización, que incluyen la vía de fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3-K), la familia de proteínas tirosina cinasas, Janus, las proteínas Src y la cascada de Ras-Raf-MAP (MAPK Li et al., 2006), de forma interesante en carcinomas serosos de ovario y endometriomas, la activación de la vía PI3-

K/Akt y GSK3 β ha sido claramente identificada (Wu, et al., 2011; Espinosa, et al., 2011).Adicionalmente, la endometriosis ha sido considerada una lesión precancerosa asociada con el cáncer de ovario (Lai, et al., 2013; Siufi, et al., 2014), sin embargo, la expresión y regulación de SCF/c-kit en el endometrio eutópico no ha sido distintivamente evaluada, esta vía podría estar participando al favorecer la función normal del endometrio eutópico y podría estar alterada en la endometriosis.

Planteamiento del problema

El estudio de la endometriosis ha sido por muchos años motivo de una intensa investigación, se conocen muchas teorías que tratan de explicar diferentes aspectos que podrían contribuir a su establecimiento, actualmente los investigadores en esta área han propuesto profundizar en los mecanismos moleculares que están promoviendo la aparición y mantenimiento de esta enfermedad, por lo que en este trabajo nos propusimos ampliar el conocimiento de la función del endometrio, a través del papel de SCF/c-kit y su posible asociación con la vía Akt/GSK3 β en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.

Hipótesis

En el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis la activación del receptor c-Kit por su ligando SCF a través de la activación de Akt y la fosforilación de GSK3 β aumentará la respuesta de proliferación mediada por Ki67 en el endometrio proliferativo y secretor de pacientes con endometriosis.

Objetivo General

Analizar la expresión de SCF/c-Kit y Ki-67 y establecer su relación con proliferación celular y la activación de la vía Akt/GSK3 β en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis.

Objetivos Específicos

Analizar y cuantificar la expresión de las proteínas SCF, c-Kit, Ki67 en las biopsias de endometrio eutópico de mujeres control y compararla con pacientes con diagnóstico de endometriosis mediante inmunohistoquímica.

Analizar y cuantificar la expresión de las proteínas Akt, pAkt, GSK3 β y pGSK3 β en las biopsias de endometrio eutópico de mujeres control y compararla con pacientes con diagnóstico de endometriosis mediante inmunofluorescencia.

Material y Métodos

Pacientes y obtención de biopsias

Todas las muestras en este estudio de casos-contróles fueron obtenidas bajo consentimiento informado de las pacientes. El comité de ética del Hospital de la Mujer, Secretaría de Salud, México, Distrito Federal, México (registro: HMINV-2012-07) aprobó el estudio, el cual fue conducido de acuerdo con las leyes y procedimientos para el manejo de tejidos humanos con la declaración de Helsinki (1964). El grupo control se formó por 25 mujeres entre las edades de 19 – 40 años de edad sin manifestaciones de endometriosis quienes tuvieron una toma de biopsia de endometrio debido a sangrado uterino, evaluación del útero ante respuesta hormonal (evidencia de ovulación), evaluación a largo plazo de amenorrea y exclusión de enfermedades pélvicas. El análisis histopatológico del grupo control estuvo conformado por 13 muestras en fase proliferativa y 12 muestras en fase secretora. Los tejidos derivados de pacientes con endometriosis fueron obtenidos de 35 mujeres, 30 de ellas no fumadoras, quienes bajo laparoscopia se determinó el estadio III y IV de endometriosis, clasificación acorde a la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (en inglés: ASRM). Los síntomas presentados con mayor frecuencia fueron menorragia, dolor pélvico o ambos, evaluados bajo laparoscopia pélvica. La edad promedio de estas pacientes fue 37 años (25-52). Los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo por expertos ginecólogos cirujanos en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital de la Mujer, Ciudad de México, México, a partir de enero de 2011 hasta octubre de 2012. Ninguna de las mujeres estuvo en tratamiento hormonal durante los tres meses previos al procedimiento quirúrgico. La fase del ciclo menstrual en estas pacientes, fue determinado por la historia clínica y por la descripción histológica de acuerdo al criterio de Noyes (1975). Las pacientes y mujeres grupo control fueron consideradas Mexicanas Mestizas y su índice de masa corporal se registró dentro del intervalo 20 a 31 kg/m².

Inmunohistoquímica

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4%; dejándolas hasta 24 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se realizó un lavado con solución tampon de fosfatos (PBS) para eliminar los residuos del fijador. Los tejidos se deshidrataron en un histocineta e se incluyeron en parafina. Previo a la realización de la inmunohistoquímica, los cortes de tejido fueron teñidos con hematoxilina-eosina para corroborar el diagnóstico clínico. Cortes seriales de 4 μm de grosor fueron utilizados el análisis inmunohistoquímico. Los tejidos incluidos en parafina fueron fijados y deshidratados en concentraciones decrecientes de etanol. La recuperación de antígeno se llevo a cabo, al someter a las muestras a ebullición en una solución de citrato de sodio 0.001 mol/L (pH 6) durante 20-40 minutos. En seguida las laminillas con tejido se lavaron con solución PBS y se incubaron con solución de albúmina al 2% durante 2 horas a TA. Concluido este tiempo, se retiro el exceso de solución de albumina de las laminillas y se colocaron las diferentes soluciones de anticuerpo primario y se incubaron 4°C en cámara húmeda toda la noche. El anticuerpo para SCF monoclonal de ratón anti humano (Santa Cruz biotechnology, Inc., Dallas, Texas) fue diluido 1:200, el anticuerpo para Ki67 (mouse monoclonal, Biocare Medical, Concord, California) fue diluido 1:100 y para la proteína c-Kit se utilizó un anticuerpo en conejo monoclonal (Biocare Medical, California) diluído 1:50. Al término del periodo de incubación las muestras fueron lavadas con PBS y marcado con el sistema de detección avidina-biotina durante 2 horas (1:200; VECTASTAIN ABC ELITE kit; Vector Laboratories, Inc, Burlington, Vermont) a TA. En seguida se lavaron las laminillas en PBS y se colocó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, California) como solución cromógena. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina y evaluadas con el microscopio Nilon Eclipse E600 (Nikon Instruments Inc., Melville, New York). Las fotografías se tomaron de 5 campos diferentes por laminilla. El número y porcentaje de células inmunopositivas para Ki67, SCF y c-Kit fue cuantificado a través del análisis de imagen con el software Image J NIH (desarrollado en US National Institutes of Health, USA, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ni-image/>) el cual transforma la imagen de color en una imagen de 8 bits; el

programa calcula la intensidad del área teñida y mide la cantidad de píxeles/pulgada cuadrada y convierte las lecturas de blanco (0) a negro (255) en una escala numérica expresadas en unidades de densidad óptica (OD). Las cuantificaciones se realizaron por dos observadores independientes. Los resultados expresados fueron analizados acorde a previos trabajos (Mendoza-Rodriguez et al., 2003).

Inmunofluorescencia

Las secciones de tejido se prepararon de forma idéntica a la descrita anteriormente, con la excepción de la obstrucción de actividad de peroxidasa, las muestras se incubaron a 4°C en una cámara húmeda durante la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS. anti-Akt1/2/3, (sc-8312, 1: 100), anti-p-Akt1 / 2/3 (sc-7985-R, 1: 100), anti-GSK3b (sc-9166, 1: 100), y anti-p-GSK3b (sc-11757-R,1: 100) anticuerpos policlonales de conejo, todos de Santa Cruz Biotechnology, fueron utilizados. Al final del período de incubación, las muestras se lavaron tres veces en PBS seguido de 2 horas de incubación en una dilución 1:200 de la inmunoglobulina específica de cabra anticonejo rodamina conjugada-G (Merck Millipore). Las muestras se contratiñeron con Hoechst 33342 benzimida (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cortes teñidos se almacenaron a 4°C antes de ser evaluados con un microscopio para fluorescencia, Nikon Eclipse E600. Al igual que en la evaluación realizada para el análisis de inmunohistoquímica, también se tomaron 5 diferentes campos por laminilla, pero usando el modo RBG en lugar de 8 bits, se evaluó la intensidad de las células inmunopositivas utilizando la imagen J software.

Análisis estadístico

Se examinaron los datos para determinar su distribución normal utilizando el test de normalidad de Shapiro-Wilk incluido en el software que usamos. Una vez corroborado, se analizaron los datos por un análisis de la prueba de varianza, seguido por una prueba post hoc usando las comparaciones de Bonferroni. Todo el análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism software 5.0 (San Diego, California). Todos los valores se expresan como la media + desviación estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativa con un valor de $P < 0,05$.

Resultados

En la imagen se observó durante la fase proliferativa de ambos casos, endometriosis y muestras de control, la superficie del epitelio, las glándulas curvas, largas, uniformes y pequeñas células del estroma con núcleos redondos y numerosas células mitóticas tanto en el epitelio glandular y estroma. En la fase secretora, el epitelio se tornó a forma cilíndrica con ciertas tortuosidades expuestas y vacuolas secretoras en el polo apical y en el estroma se mostraron cambios edematosos. Acorde con esta evidencias consideramos que la morfología endometrial eutópica de muestras de control y la endometriosis fueron similares en ambas fases, proliferativa y secretora (Figura 4A-D).

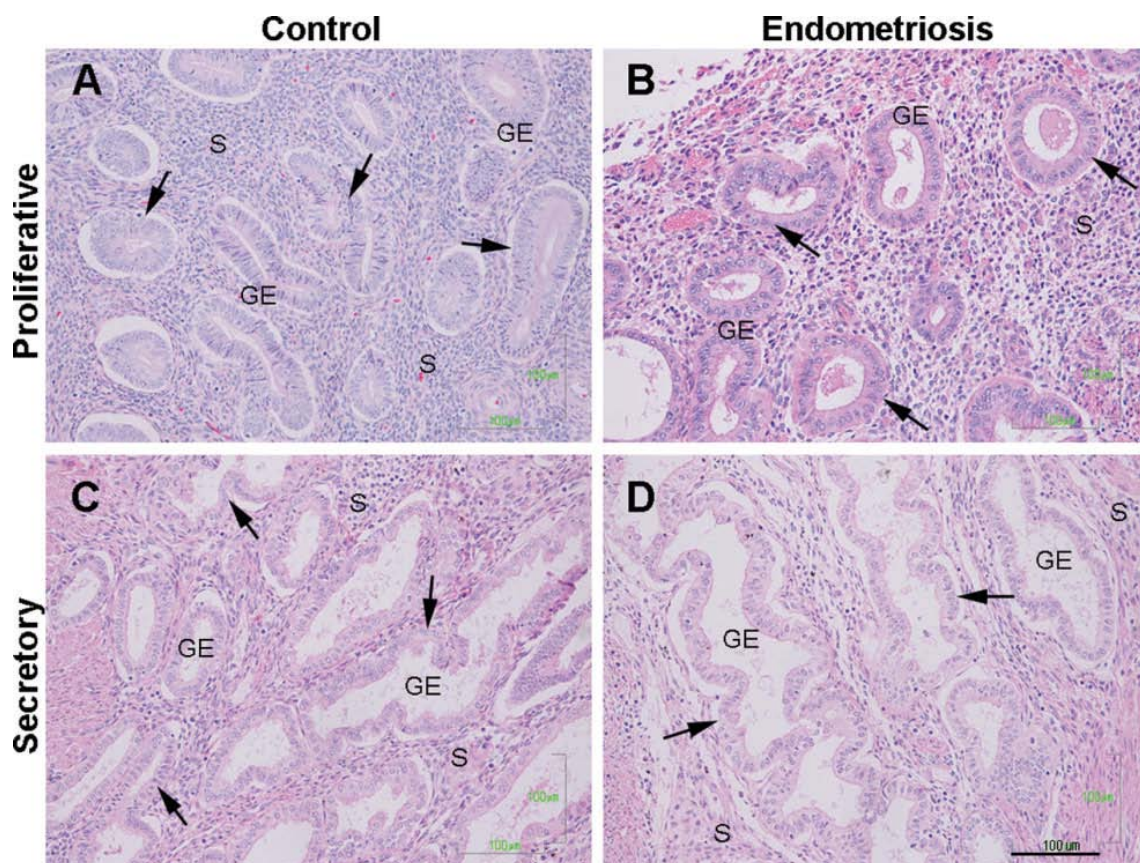


Figura 4. Arquitectura histológica de grupo control y endometrio eutópico con endometriosis. La imagen representa la organización histológica de el epitelio glandular (GE) y el estroma (S) del control (A y C) y el endometrio eutópico con endometriosis (B y D) en las fases proliferativa y secretora del ciclo menstrual. Las flechas muestran típico GE en la fase proliferativa (A y B) y la fase secretora (C y D), en el control y el endometrio con endometriosis, respectivamente. La barra muestra una escala 100 μ m. Las biopsias fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Expresión de Ki67, SCF y del receptor c-Kit

El aumento significativo en el número núcleos inmunopositivos para el antígeno Ki67 se observó en el epitelio glandular durante la fase proliferativa de las mujeres con endometriosis. No se observaron diferencias histológicas en las células del estroma de la endometriosis y muestras de control en la misma fase (Figura 5). El porcentaje promedio de células inmunopositivas para Ki67 en la muestras con endometriosis fue de 93,84% + 19% vs 62% + 94% en el control grupo ($P < 0,01$; Figura 5 A y B).

Inesperadamente, el aumento altamente significativo en el porcentaje promedio de células inmunopositivas para Ki67 se observó 62,14% + 8,27% frente al 5,4% + 1,64% en el epitelio glandular de muestras durante la endometriosis fase secretora ($P < 0,01$; Figuras 5D) en comparación con muestras de control (Figura 4C); esta diferencia también se observó en el estroma y fue significativa (25,14% + 6,76% vs 2,58% + 0,8%, $P < 0,05$; figura 5).

La expresión de SCF en el epitelio glandular y las células del estroma de muestras con endometriosis también aumentó en el fase proliferativa en comparación con las biopsias control (Figura 5E y F). Las diferencias fueron altamente significativas (171.9 +27.5 OD vs 62,19 + 7,91 OD, $P < 0,01$) para el epitelio glandular. También se encontraron diferencias en la expresión de SCF en el estroma (63.31 + 15.09 OD vs 7.25 + 2.09 OD; $P < 0,05$; figura 5F).

Fue interesante observar que en el secretora fase de biopsias con endometriosis, las diferencias altamente significativas también fueron observadas; y particularmente el aumento notable en la expresión de SCF en el epitelio glandular (120,6 + 23,17 vs OD11,97 + 9,87 OD, $P < 0,01$) y en las células del estroma (64,82 +19.43 OD vs 7.25 + 2.09 OD, $P < 0,05$; Figura 5G y H) en comparación con el grupo control. La expresión de receptor c-Kit se observó sólo en el epitelio glandular de las biopsias con endometriosis en la

fase proliferativa y en la fase secretora (Figura 5 I y L). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($93,38 \pm 16,82$ vs $53,76 \pm 6,74$ OD para la fase proliferativa y $90,47 \pm 15,36$ vs $51,69 \pm 10,90$ OD; $P < 0,05$) en comparación con el biopsias control. Una observación interesante fue la presencia ocasional de células positivas de c-Kit en el estroma de las biopsias de control.

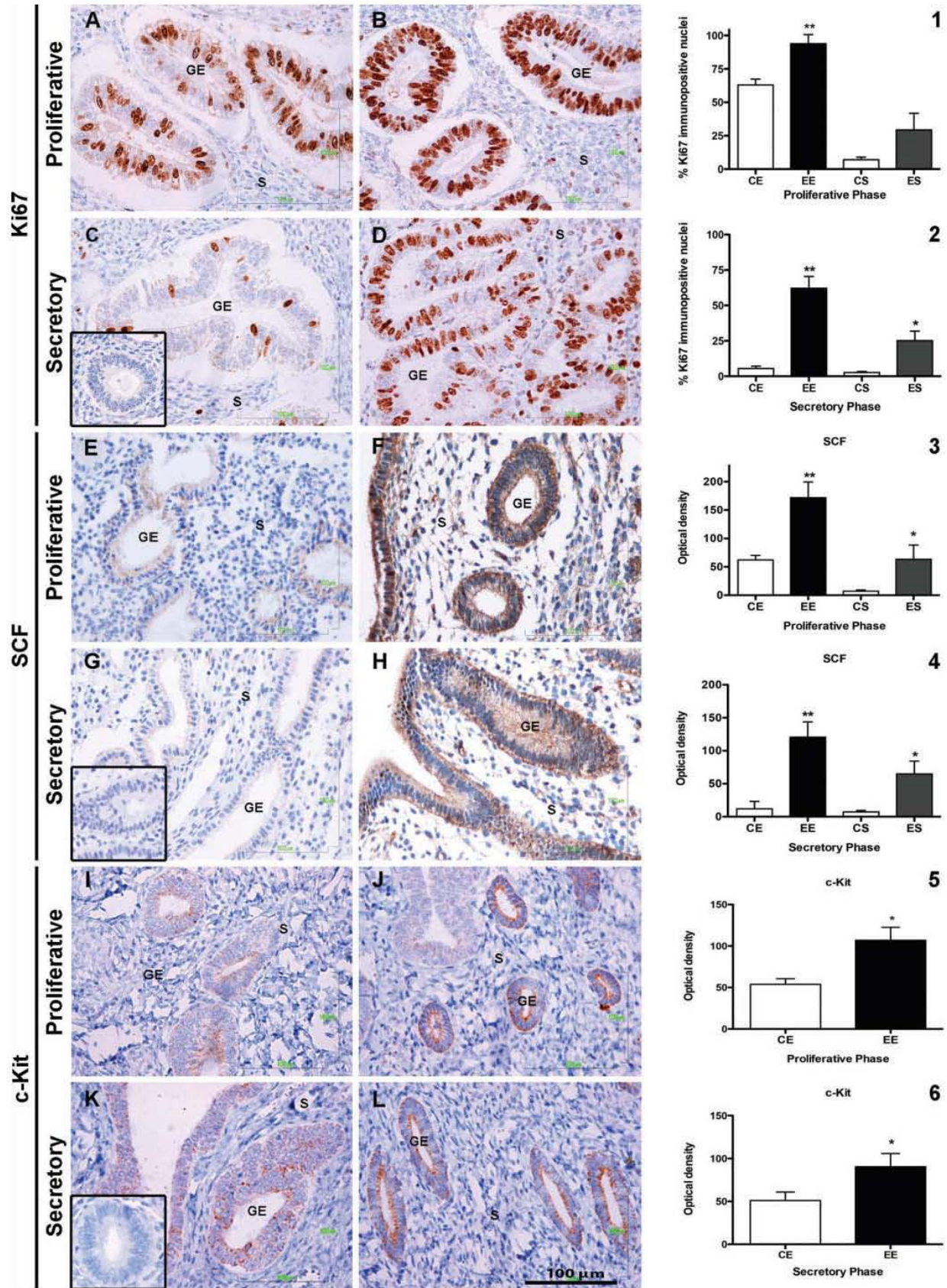


Figura 5. Expresión de Ki67, SCF, y c-Kit en el endometrio control y el endometrio eutópico con endometriosis. Imagen representativa de la expresión de Ki67 en el control y la endometriosis eutópica en la fase proliferativa (A y B, respectivamente) y en la fase secretora (C y D). El porcentaje de núcleos inmunopositivos para Ki67 en EE y ES comparación con CE y CS se muestra tanto en la fase proliferativa (1) y la fase secretora (2). Imagen representativa de la expresión de stem cell factor (SCF) bajo los mismos parámetros a Ki67 se muestran en (E) y(H), el porcentaje de SCF células inmunopositivas en EE y EE en comparación a CE y CS se muestra tanto en la proliferativa (3) y las fases secretoras (4). (Continuación) La expresión de c-kit se muestra en (I) a (L). El porcentaje de células inmunopositivas c-kit en la CE y EE se muestra en fase proliferativa (5) y la fase secretora (6). La tinción con IgG como control negativo se muestra en el recuadro inferior a la izquierda de (C), (G) y (K) para cada uno de los anticuerpos). S y GE dentro de cada figura señalan el estroma y el epitelio glandular, respectivamente. La ampliación es 400x, la barra de escala = 100 μ m. Los histogramas en el lado derecho de las imágenes representan la media + desviación estándar de los valores obtenidos para las muestras control y con endometriosis (n = 35) y el control (n = 25) en las fases proliferativa o secretora. * P <0,05 y ** P <0,01. CE indica el epitelio de control; EE, endometriosis epitelio; CS, controlar estroma; ES, estroma endometriosis; Isotipo IgG, inmunoglobulina G.

Expresión de p-Akt y p-GSK3 β

No se observaron diferencias significativas en la expresión de Akt y GSK3 β en las fases proliferativa y secretora entre las biopsias de los grupo control y con endometriosis. En cambio si se observó el aumento significativo en la expresión de la proteína Akt fosforilada(S473) en las biopsias en fase proliferativa con endometriosis en comparación con las biopsias control (p <0,05); Curiosamente, esta sobreexpresión permaneció aumentada en la fase secretora de la biopsias con endometriosis, mientras que, como se esperaba, las biopsias del grupo control mostraron una reducción de casi 50% en la expresión pAkt; las diferencias fueron altamente significativas (Figura 6 H e I; P <0,01). De manera idéntica se observó este comportamiento con las mismas diferencias estadísticas cuando se evaluaron y analizaron los resultados en la expresión de la proteína pGSK3 β (S9) (Figura 7).

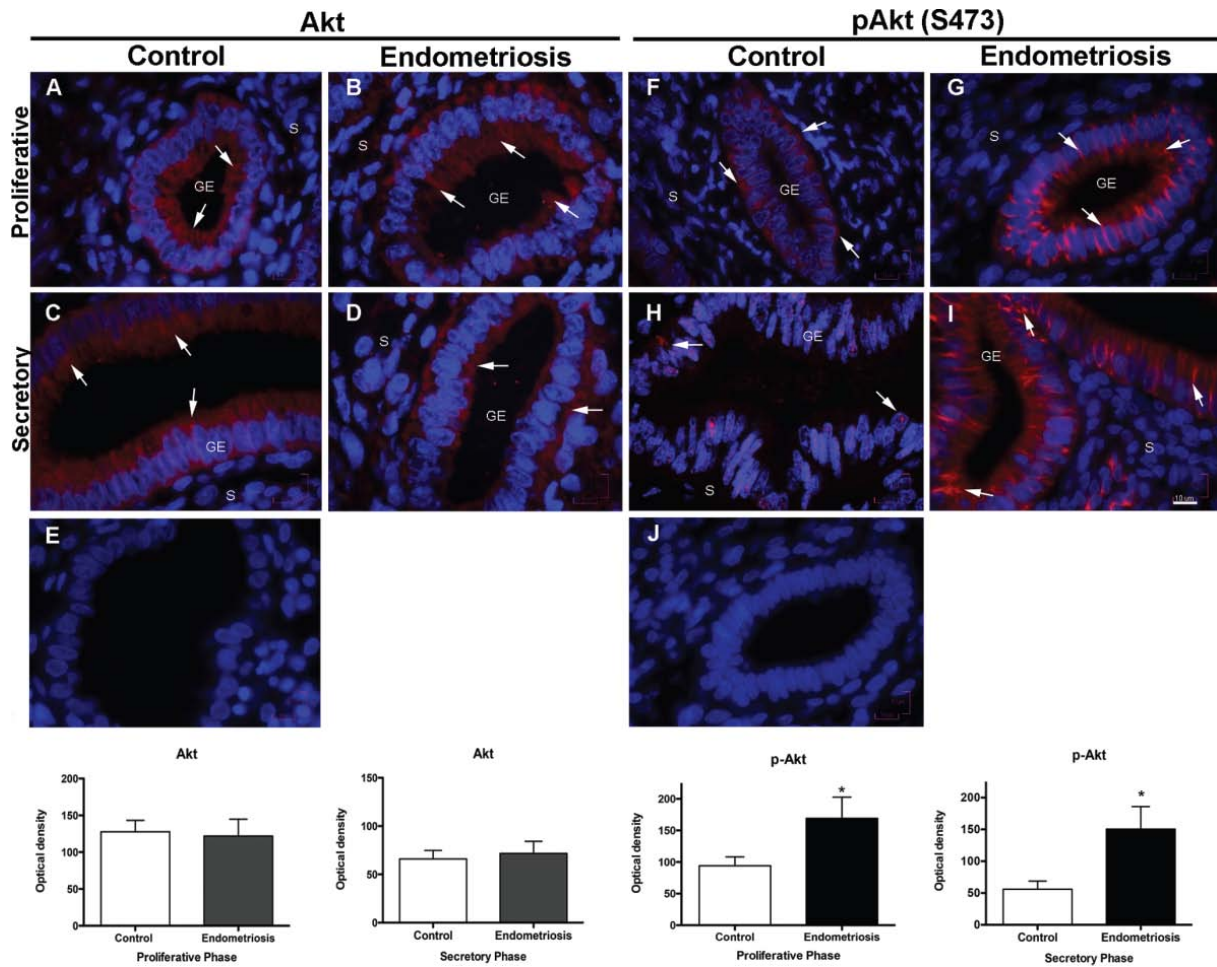


Figura 6. La expresión de Akt y pAkt (S473) en el control y el endometrio eutópico con endometriosis. Imágenes representativas de la expresión de Akt y pAkt (S473) en la fase proliferativa del endometrio control (A y F) y la endometriosis eutópica (B y G). C y H, expresión de Akt y pAkt (S473) durante la fase secretora del endometrio control y (D e I) en el endometrio eutópico con endometriosis. E y J, Tinción par IgG como control negativo para cada uno de los anticuerpos. Las flechas muestran la localización Akt y pAkt (S473) principalmente en el epitelio glandular. Ampliación x1000, barra de escala = 10 μ m. Los histogramas representan el valor medio + la desviación estándar de los valores obtenidos para las muestras de endometrio con endometriosis (n = 35) y el grupo control (n = 25) para cada inmunotinción en la proliferativa y las fase secretora. * P < 0,05. GE indica epitelio glandular; S, estroma.

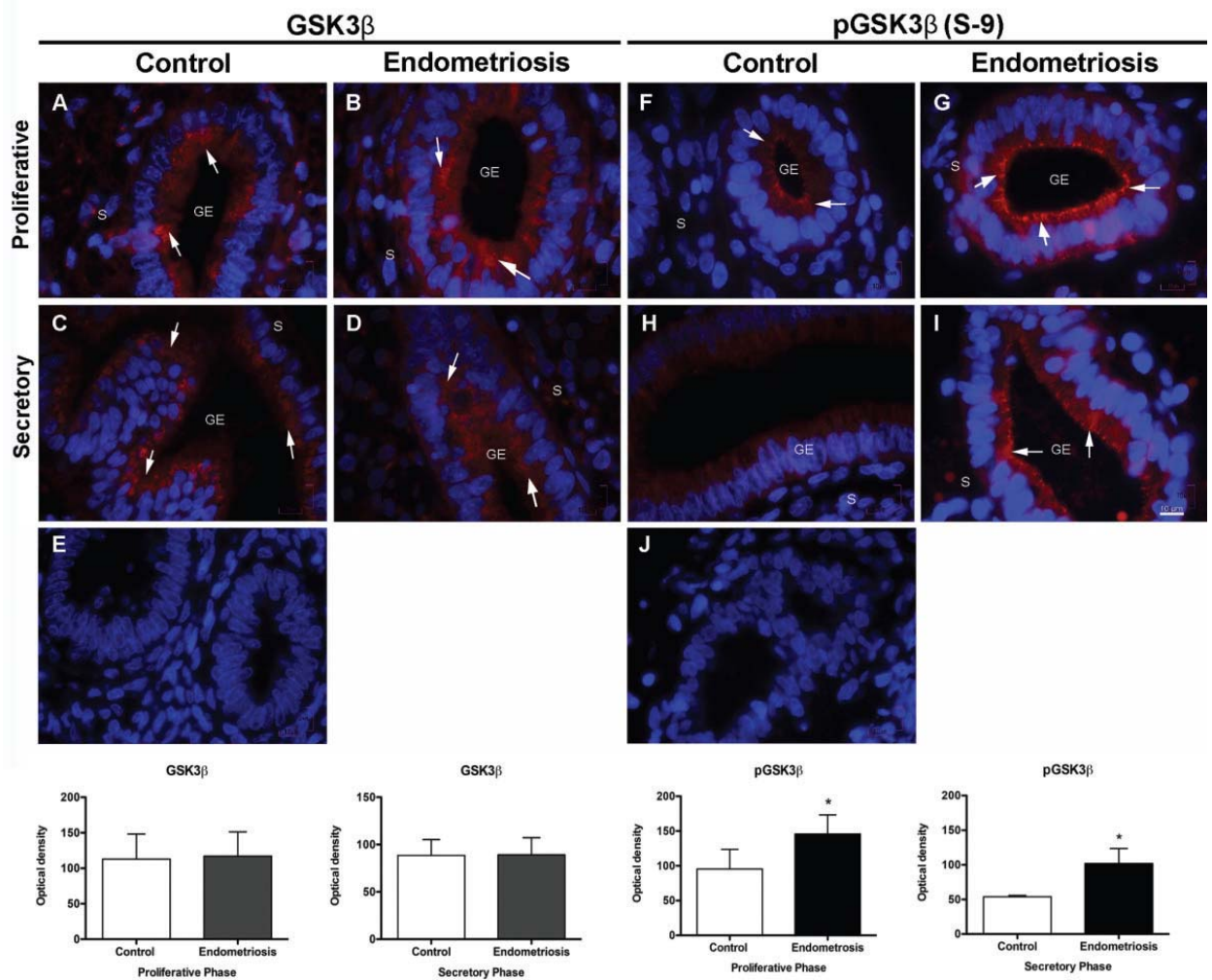


Figura 7. Expresión de GSK3 β y pGSK3 β (S9) en el grupo control y el endometrio eutópico con endometriosis. Imágenes representativas de la expresión proteica de GSK3 β y pGSK3 β (S9) en la fase proliferativa del endometrio control (A y F) y el endometrio con endometriosis (B y G). C y H, expresión de GSK3 β y pGSK3 β (S9) durante la fase secretora del endometrio control (D e I) y en el endometrio eutópico con endometriosis. Las flechas muestran la localización de GSK3 β y pGSK3 β (S9). E y J, Control negativo, tinción de inmunoglobulina G como control negativo para cada uno de los anticuerpos. Ampliación x1000, barra de escala = 10 μ m. Los histogramas representan el valor promedio + la desviación estándar obtenidos en las muestras de endometrio con endometriosis (n = 35) y en el grupo control (n = 25) para cada una de las fases, proliferativa y secretora. * P < 0,05. GE indica epitelio glandular; S, estroma.

Discusión

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por el aumento de la proliferación celular, la adhesión, y la invasión de células del estroma y epitelio glandular derivadas del debrís celular en cada ciclo menstrual y que provienen del endometrio eutópico hacia zonas externas como en la cavidad pélvica (Delbandi, et al., 2013).

Nuestros resultados no muestran evidentes diferencias histológicas entre el endometrio eutópico con endometriosis y las biopsias control. Esto sugiere que en pacientes con endometriosis la concentración relativa de hormonas esteroides no está alterada, pero no se descarta que es una patología estrógeno-dependiente con resistencia a la progesterona debido a los bajos niveles de su receptor (al-Sabbagh, et al., 2012; Attia, et al., 2001). De hecho, la regulación de los diferentes subtipos de receptor de estrógeno e isoformas del receptor de progesterona están asociadas a las respuestas a hormonas esteroides y difieren entre endometrio eutópico normal y con endometriosis (Kim, et al., 2013), aunque las evidencias más recientes muestran que elevadas concentraciones endometriales de estrona y estradiol en tejido endometriótico se determinan más por el metabolismo local que los niveles circulantes (Huhtinen, et al., 2012).

La proliferación de células epiteliales y estromales en las biopsias con endometriosis aumentó en la fase proliferativa determinado por el marcador del ciclo celular Ki67, pero fue inesperadamente más alta en la fase secretora de estas biopsias. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Mourtzikou (2012) para las biopsias de control, pero tenemos resultados opuestos en las biopsias con endometriosis. La expresión de Ki67 es dependiente de estrógenos y también está vinculada a SCF/c-kit en otros tejidos y algunos cánceres (Li, et al., 2013; Krasagakis, et al., 2009). El aumento de la proliferación celular se ha relacionado con una reducción de la muerte celular y un aumento en la proliferación celular debido a la abundancia de c-myc (Johnson, et al., 2005), aunque una regulación diferencial de micro-ARN en la

fase secretora y proliferativa del ciclo, el cual está bajo control hormonal, también ha sido considerado (Belleudi, et al., 2010).

Se ha sugerido que las diferentes poblaciones de células madre contribuyen a la patogénesis de la endometriosis (Forte, et al., 2014) SCF y su receptor c-Kit regulan la diferenciación, proliferación, la supervivencia de las células madre/pluripotentes en el endometrio normal y desempeñan un papel importante en el desarrollo folicular (Oliveira, et al., 2012). La expresión de SCF aumenta en la fase proliferativa y disminuye en el fase secretora en cada ciclo normal del endometrio (Kauma, et al., 1996). Un interesante resultado aunque relativamente poco frecuente fue que algunas de las biopsias de las mujeres con y sin endometriosis mostraron ocasionalmente células c-Kit + en el estroma, células que podrían pertenecer a algún tipo de células estromales mesenquimales indiferenciadas que requieren c-Kit para su mantenimiento (Suphanantachat, et al., 2014). Estas células son posiblemente lo que se consideran en el endometrio humano como “endometrial side population cells” que corresponden a células progenitoras somáticas y expresan al receptor c-Kit (Cevelló, et al., 2010); ellas pueden encontrarse en compartimentos epiteliales o del estroma(Chan, et al., 2004), solo que las células identificadas en estas biopsias se encuentran principalmente en el estroma por lo que están débilmente activadas por SCF, el cual se expresa altamente en epitelio glandular. No podríamos establecer una relación entre el número de estas células madre putativas y el grado de endometriosis; sin embargo, es posible que estas células estén regulando el efecto de factores de crecimiento sobre la proliferación y la diferenciación de células endometriales (Suphanantachat, et al. 2014)y a su vez tener un papel central en la endometriosis. Schwab et al (2005) han demostrado que la clonogenicidad no varía de la de la fase proliferativa a la fase secretora del ciclo menstrual en el endometrio entre ciclos activos o inactivo. Por lo tanto, lo que sugiere una compleja regulación de estas probables células progenitoras en el endometrio posiblemente dependiente de la producción local de hormonas y factores de crecimiento.

Nuestros resultados mostraron que la expresión de SCF aumentó significativamente en las células del epitelio y del estroma glandulares, mientras que su receptor c-Kit sólo se incrementó en el epitelio glandular, tanto en ambas fases, proliferativa y secretora en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis. Los cambios temporales en la expresión SCF del y del receptor c-Kit durante el ciclo 11 menstrual normal ha sido reportado en tejidos endometriales benignos (Mitsunari, et al., 1999), lo que sugiere su posible implicación en la función del endometrio. Sin embargo, la expresión de c-kit es controvertida, ya que su expresión en el endometrio de mujeres con endometriosis no parece diferir de las mujeres sin endometriosis (Elmore, et al., 2001). Por otra parte, también demostramos un importante aumento en la expresión de pAkt y pGSK3 β en el epitelio glandular durante las fases proliferativa y secretora del endometrio con endometriosis. La interacción SCF/c-kit está implicada en muchas funciones celulares tales como la supervivencia, la proliferación y la apoptosis a través de la vía PI3K/Akt (Uzan, et al., 2005) y GSK3 β , una cinasa reguladora clave que participa en numerosas vías de señalización. Esta vía de señalización participa en la proliferación epitelial en el endometrio uterino (Brunet, et al., 2011; Toyofuku, et al., 2006), Akt aumenta la supervivencia de células de endometrio y estradiol induce la fosforilación de Akt en las células del estroma lo que sugiere que podría estar involucrado en la alteración de la regulación de la apoptosis/proliferación en la endometriosis (Cinar, et al., 2009). Esto sugiere que SCF/c-kit podría promover la proliferación de células epiteliales y su supervivencia a través de la señalización Akt/GSK3 β , no sólo en la fase proliferativa sino también en el fase secretora de la endometriosis. GSK3 β es constitutivamente activa y su actividad está regulada negativamente, principalmente a través de la fosforilación Ser9 (Forde, et al, 2007; Chen, et al., 2005) seguido por Tyr216 fosforilación que están mediadas por Akt (Grimes, et al., 2001). Hemos demostrado que Akt y GSK3 β permanecieron fosforiladas durante la fase secretora en las biopsias con endometriosis. La fosforilación de Akt regula a la alza la expresión de genes de supervivencia celular y regula a la baja la apoptosis (Kockeritz, et al., 2006). Nuestros resultados confirman las observaciones realizadas por Silveira et al (2012), pero podría considerarse

desconcertante ya que la progesterona inhibe la vía Akt/GSK3 β relacionada con la proliferación epitelial (Matsuzaki, et al., 2009), GSK3 β mantiene la estabilidad del receptor a progesterona (Wang, et al., 2013). Nuestros resultados refuerzan la importancia de la vía PI3K/Akt en la endometriosis, pero contrario a los resultados de Cinaret al (2009), nosotros mostramos que la expresión pAkt fue sostenida en las dos fases del ciclo, especialmente en la fase secretora, la cual no es dependiente de estradiol, abogando así a Akt como un participante importante en la patogénesis de la endometriosis. En resumen nuestros resultados en este trabajo indican que hay un incremento en la expresión de SCF/c-kit y una falla en el mecanismo de señalización que promueve la perpetua fosforilación de Akt y GSK3 β en el endometrio eutópico con endometriosis que mantiene la proliferación de células epiteliales en la fase secretora del ciclo menstrual. Reconocemos que nuestros resultados se basan únicamente en el análisis por inmunohistoquímica lo que permite sugerir que experimentos funcionales, tales como la inhibición terapéutica de Akt (Folkes, et al., 2008), sería deseable y que hasta el momento no están siendo considerados en la endometriosis.

Conclusión

La incesante proliferación celular en la fase secretora esta asociada a la desregulación de la vía de señalización de SCF/c-kit vinculada a la activación de Akt fosforilado/GSK3 β fosforilado del endometrio eutópico con endometriosis.

Perspectivas

Se propone profundizar en el análisis y origen de la sobre-expresión de SCF en el epitelio glandular en el endometrio eutópico a nivel de RNA mensajero y principales reguladores asociados.

Actualmente, se ha descrito la regulación de genes a través de la expresión de micro-RNAs que se encuentra modulando la expresión de sus proteínas blanco de forma tejido específica, al respecto se sabe que los mirs-139, 221 y -222 han sido asociados con SCF y c-kit, por lo que resulta de manera interesante identificarlos en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.

Otro aspecto relevante, es la relación descrita entre SCF y los mecanismos de nocicepción, se sabe que una de los signos importantes en la endometriosis es la generación de dolor pélvico a diferentes umbrales y que incluso pueden resultar discapacitante, nuevamente, de manera más que interesante es muy importante poder describir la contribución de esta proteína o del eje SCF/c-kit en la generación de estímulos dolorosos en esta patología si bien ampliamente estudiada, es cierto que aun encierra procesos clave aun no descrito para su patogénesis

Literatura citada

Comiter CV: Endometriosis of the urinary tract. *Urol Clin North Am*2002; 29:625.
Giudice LC, Kao LC: Endometriosis. *Lancet*2004; 364:1789.

Sharpe-Timms KL. Basic research in endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*1997; 24:269–90.

Vercellini P1, Chapron C, Fedele L, Frontino G, Zaina B, Crosignani PG. Evidence for asymmetric distribution of sciatic nerve endometriosis. *Obstet Gynecol*2003 ;102(2):383-7.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain* 2009;10(9) 895-926.

Burns WN, Schenken RS. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42:586-610.

Endometriosis. Chapter 10. Disponible en:http://www.mhprofessional.com/downloads/productos/0071472576/0071472576_chap10.pdf [Fecha de consulta, octubre 2014].

Olive DL, Pritts EA. Treatment of Endometriosis. *N Engl J Med* 2001;345 (4):266-275.

Bouquet De Jolinère J, Ayoubi JMB, Gianaroli L, Dubuisson JB, Gogusev J, Feki A. Endometriosis: a new cellular and molecular genetic approach for understanding the pathogenesis and evolutivity. *Frontiers in Surgery*. 2014; 1(16): 1-12.

Sampson JA: Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*1927; 14:442.

Velasco-Ruiz I, Campos-Ferrer A, Anién-Alvarez P, Quereda-segui F. Antiendometrial antibodies and endometriosis. *Immunologia* 2002; 21(2):87-91.

Van Langedonck A, Casanas-fouc F, Doonez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fétil Steril* 2002; 775(5): 861-870.

Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30:41–61.

Ueki M: Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol*1991; 165:201.

Mitchell AO, Hoffman AP, Swartz SE, et al: An unusual occurrence of endometriosis in the right groin: a case report and review of the literature. *Mil*

Med 1991; 156:633.

Moore JG, Binstock MA, et al: The clinical implications of retroperitoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 158:1291.

McMeekin DS, Tillmanns T: Endometrial cancer: treatment of nodal metastases. *Curr Treat Options Oncol* 2003; 4:121.

Vinatier D, Orazi G, Cosson M, et al: Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96:21.

Bontis JN, Vavilis DT: Etiopathology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 816:305.

Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, et al: Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47(Suppl 1):18.

Li T, He H, Liu R, Wang SX, Pu DM. Isolation and identification of epithelial and stromal stem cells from eutopic endometrium of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; 178, 89-94.

Hsu Ya-Chieh, Li L, Fuchs E. Transit-Amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell*. 2014; 157, 935-949.

Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010;16:818–34.

Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1127:106–15.

Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, et al. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008;135:551–8.

Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod* 2008;23:934–43.

Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, Moscarini M. Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril* 2011;95:1171–3.

Park JH, Daheron L, Kantarci S, Lee BS, Teixeira JM. Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Endocrinology* 2011;152:1080–9.

Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow

- transplant recipients. *JAMA* 2004; 292(1):81-5.
- Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T, Okano H. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS ONE* 2010;5(4):e10387. doi: 10.1371/journal.pone.0010387.
- Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence?. *Hum Reprod Update* 2007;13:87–101.
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, et al. Genomic alterations in ectopic and eutopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:148–59.
- Jiang QY, Wu RJ: Growth mechanisms of endometriotic cells in implanted places: a review. *Gynecol Endocrinol* 2012, 28:562–567.
- Pellegrini C, Gori I, Achtari C, Hornung D, Chardonnens E, Wunder D, Fiche M, Canny GO: The expression of estrogen receptors as well as GREB1, c-MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2012, 98:1200–1208.
- Shazand K, Baban S, Privé C, Malette B, Croteau P, Lagacé M, Racine JB, Hugo P. FOXO1 and c-jun transcription factors mRNA are modulated in endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2004 Dec;10(12):871-7.
- Schneider J, Jimenez E, Rodriguez F, del Tanago JG. c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis. *Oncol Rep*. 1998;5(1):49-52.
- Klemmt PA, Carver JG, Koninckx P, McVeigh EJ, Mardon HJ: Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod* 2007, 22:3139–3147.
- Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ: Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF beta-receptors in human endometrial tissue: localization and in vitro action. *Endocrinology* 1992, 130:2373–2385.
- Chung HW, Wen Y, Choi EA, Hao L, Moon HS, Yu HK, Polan ML: Pleiotrophin (PTN) and midkine (MK) mRNA expression in eutopic and ectopic endometrium in advanced stage endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:350–355.
- Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman G: Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008, 23:2701–2708.
- Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M, Carlstrom K: Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril* 2001, 75:489–495.

Yoshida S, Harada T, Mitsunari M, Iwabe T, Sakamoto Y, Tsukihara S, Iba Y, Horie S, Terakawa N: Hepatocyte growth factor/Met system promotes endometrial and endometriotic stromal cell invasion via autocrine and paracrine pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:823–832.

Matarese G, Alviggi C, Sanna V, Howard JK, Lord GM, Carravetta C, Fontana S, Lechler RI, Bloom SR, De Placido G: Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2483–2487.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239– 257.

Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:77– 92.

Nasu K, Nishida M, Kawano Y, Tsuno A, Abe W, Yuge A, Takai N, Narahara H. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2011;18:206–218.

Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165:75–83.

Cinar O, Seval Y, Uz YH, Cakmak H, Ulukus M, Kayisli UA, Arici A. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:864– 871.

Eaton JL, Unno K, Caraveo M, Lu Z, Kim JJ. Increased AKT or MEK1/2 activity influences progesterone receptor levels and localization in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:E1871–E1879.

Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 2001;142:4086–4094.

Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:47.

Caron PL, Frechette-Frigon G, Shooner C, Leblanc V, Asselin E. Transforming growth factor β isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:80.

Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:265–269.

Lathi RB, Hess AP, Tulac S, Nayak NR, Conti M, Giudice LC. Dose-dependent insulin

regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1599–1606.

Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vignani P, Di Blasio AM. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17 β -estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 2007; 13:317–322.

Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, Tokunaga H, Su EJ. Role of estrogen receptor-beta in endometriosis. *Semin Reprod Med* 2012; 30:39–45.

Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2897–2902.

Beliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004;82:80–85

Al-Sabbagh M, Lam EW, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358:208–215

Fazleabas AT. Progesterone resistance in a baboon model of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2010;28:75–80.

Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;132:107–110.

Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:1141–1147.

Gomes MK, Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, de Sa Rosa-e-Silva AC, Turatti A, Vieira CS, Ferriani RA. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cell proliferation, Fas expression and steroid receptors in endometriosis lesions and normal endometrium. *Hum Reprod* 2009;24: 2736–2745.

Wieser F, Vigne JL, Ryan I, Hornung D, Djalali S, Taylor RN. Sulindac suppresses nuclear factor-kappaB activation and RANTES gene and protein expression in endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6441–6447.

Gonzalez-Ramos R, Van Langendonck A, Defrere S, Lousse JC, Mettlen M, Guillet A, Donnez J. Agents blocking the nuclear factor-kappaB pathway are effective inhibitors of endometriosis in an in vivo experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 2008;65:174–186.

Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A: STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197:157–168.

Turkson J, Jove R: STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000; 19:6613–6626.

Buettner R, Mora LB, Jove R: Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002; 8:945–954

Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T: STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J* 1998; 17:6670–6677.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H: Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2000–2008.

Massague J: TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753–791.

Massague J, Wotton D: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19:1745–1754.

Grady WM: Transforming growth factor-beta, Smads, and cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3151–3154.

Meng XM, Chung AC, Lan HY: Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci* 2013; 124:243–254.

Malhotra N, Kang J: SMAD regulatory networks construct a balanced immune system. *Immunology* 2013; 139:1–10.

Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA: Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011; 2:135–164.

Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M: Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 2011; 30:3477–3488.

Roskoski R Jr: ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66:105–143.

Liu H, Lang JH. Is abnormal eutopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit.* 2011;17(4):RA92-9. Review.

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/Akt: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:760-768.

Lee IJ, Kim JJ. Influence of AKT on Progesterone Action in Endometrial Diseases. *Biol Reprod* 2014; 91(3):63, 1–10.

Honda H, Barreto FF, Gogusev J, Im DD & Morin PJ 2008 Serial analysis of gene expression reveals differential expression between endometriosis and normal endometrium. Possible roles for AXL and SHC1 in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6 59.

Zhang H, Li M, Zheng X, Sun Y, Wen Z & Zhao X. Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro. *Molecular Human Reproduction* 2009; 15 653–663.

Laudanski P, Szamatowicz J, Kowalczyk O, Kuzmicki M, Grabowicz M & Chyczewski L. Expression of selected tumor suppressor and oncogenes in endometrium of women with endometriosis. *Human Reproduction* 2009; 24 1880–1890.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell signal* 2002; 14:381-395.

Ozlem Guzeloglu Kayisli, Umit A. Kayisli, Guven Luleci, and Aydin Arici. In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent. *Biol Reprod* 2004; 71, 714–721.

Kim TH, Yu Y, Luo L, Lydon JP, Jeong JW, Kim JJ. Activated Akt pathway promotes establishment to endometriosis. *Endocrinology* 2014; 155: 1921-1930.

Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, Moscarini M. Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95 (3) 1171-1173.

Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H, Kim SK. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril* 2004; 81(2):403-407.

Roskoski R Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 337(1):1-13.

Sharkey AM, Jokhi PP, King A, Loke YW, Brown KD, Smith SK. Expression of c-kit and kit ligand at the human maternal-fetal interface. *Cytokine.* 1994; 6(2):195-205.

Göette M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, M.D. Kiesel L, Schüring A. Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis. *Fertil*

Steril 2011;95:338–41.

Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroid JP, Daraï E. Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. *J Reprod Immunol* 2005; 65:55-63.

Yarden Y, Kuang WY, Yang-Feng Y, Coussens L, Munemitsu L, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich U. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6:3341–3351.

Kauma S, Huff T, Krystal G, Ryan J, Takacs P, Turner T. The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(3):1261-1266.

Saito S, Enomoto M, Sakakura S, Ishii Y, Sudo T, Ichijo M. Localization of stem cell factor (SCF) and c-kit mRNA in human placental tissue and biological effects of SCF on DNA synthesis in primary cultured cytotrophoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205(3):1762-1769.

Wu R, Hu TC, Rehemtulla A, Fearon ER, Cho KR. Preclinical testing of PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitors in a mouse model of ovarian endometroid adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(23):7359-7372.

Espinosa I, Catusus L, Canet B, DA'ngelo E, Muñoz J, Prat J. Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol* 2011;24(6):846-854.

Lai CR, Hsu CY, Chen YJ, Yen MS, Chao KC, Li AF. Ovarian cancers arising from endometriosis: a microenvironmental biomarker study including ER, HNF1 α , p53, PTEN, BAF250a, and COX-2. *J Chin Med Assoc* 2013;76(11):629-634.

Siufi Neto J, Kho RM, Dos Santos Siufi DF, Baracat EC, Anderson KS, Abrao MS. Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *J Minim Invasive Gynecol* 2014;21(1):55-63.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122(2):262-263.

Mendoza-Rodriguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, et al. c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev* 2003; 64(4):379-388.

Delbandi AA, Mahmoudi M, Shervin A, et al. Eutopic and ectopic stromal cells from patients with endometriosis exhibit differential invasive, adhesive, and proliferative behavior. *Fertil Steril* 2013; 100(3):761-769.

Al-Sabbagh M, Lam EW, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358(2): 208-215.

Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(8):2897-2902.

Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 2013;34(1):130-162.

Huhtinen K, Desai R, Stahle M, et al. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(11):4228-4235.

Mourtzikou A, Kosmas K, Marouga A, Stamouli M, Pouliakis A, Karakitsos P. The use of an immunocytochemical double-labeling staining can display the distribution of Bcl-2/Ki-67 cells in endometrial adenocarcinomas as well as in normal endometrium. *Clin Lab* 2012;58(1-2):133-144.

Li W, Jia M, Qin X, Hu J, Zhang X, Zhou G. Harmful effect of ERbeta on BCRP-mediated drug resistance and cell proliferation in ERa/PR-negative breast cancer. *FEBS J* 2013;280(23): 6128-6140.

Krasagakis K, Kruger-Krasagakis S, Eberle J, Tsatsakis A, Tosca AD, Stathopoulos EN. Co-expression of KIT receptor and its ligand stem cell factor in Merkel cell carcinoma. *Dermatology* 2009;218(1):37-43.

Johnson MC, Torres M, Alves A, et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:45.

Belleudi F, Cardinali G, Kovacs D, Picardo M, Torrisi MR. KGF promotes paracrine activation of the SCF/c-KIT Axis from human keratinocytes to melanoma cells. *Transl Oncol* 2010;3(2):80-90.

Forte A, Cipollaro M, Galderisi U. Genetic, epigenetic and stem cell alterations in endometriosis: new insights and potential therapeutic perspectives. *Clin Sci* 2014;126(2):123-138.

Oliveira FR, Dela Cruz C, Del Puerto HL, Vilamil QT, Reis FM, Camargos AF. Stem cells: are they the answer to the puzzling etiology of endometriosis? *Histol Histopathol* 2012;27(1):23-29.

Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y. A role for c-kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 2014; 35(11): 3618-3626.

Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, et al. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One* 2010;5(6):e10964.

Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 70(6):1738-1750.

Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005;84(suppl 2):1124-1130.

Mitsunari M, Harada T, Tanikawa M, Iwabe T, Taniguchi F, Terakawa N. The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod* 1999;5(9):874-879.

Elmore LW, Domson K, Moore JR, Kornstein M, Burks RT. Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125(1): 146-151.

Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Darai E. Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. *J Reprod Immunol* 2005; 65(1): 55-63.

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 2011;11(3):297-305.

Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y. Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 2006;21(5):1122-1128.

Cinar O, Seval Y, Uz YH, et al. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(6):864-871.

Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/GSK-3 β /cyclin D1/pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2005;19(8):1978-1990.

Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(15):1930-1944.

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 2001;65(4): 391-426.

Kockeritz L, Doble B, Patel S, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3—an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets* 2006;7(11):1377-1388.

Silveira CG, Abrao MS, Dias JA Jr, et al. Common chromosomal imbalances and stemness-related protein expression markers in endometriotic lesions from different anatomical sites: the potential role of stem cells. *Hum Reprod* 2012; 27(11):3187-3197.

Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Pouly JL, Mage G. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility. *Hum Reprod* 2009;24(12):3180-3187.


Wang S, Li Y, Hsu PH, Lee SY, Kim Y, Lee EY. Progesterone receptor A stability is mediated by glycogen synthase kinase-3b in the Brca-1 deficient mammary gland. *J Biol Chem* 2013; 288(36):26265-26274.

Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2 d]pyrimide (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008;51(18):5522-5532.

Apéndice: Artículo requisito

Unremitting Cell Proliferation in the Secretory Phase of Eutopic Endometriosis: Involvement of pAkt and pGSK3 β

Yanira Franco-Murillo, MSc¹,
 José Antonio Miranda-Rodríguez, MD²,
 Erika Rendón-Huerta, PhD³, Luis F. Montaña, PhD³,
 Gerardo Velázquez Cornejo, MD⁴, Lucila Poblano Gómez, MD⁴,
 Francisco Javier Valdez-Morales, MSc¹,
 Ignacio Gonzalez-Sanchez, MD¹, and Marco Cerbón, PhD¹

Reproductive Sciences
 1-9
 © The Author(s) 2014
 Reprints and permission:
 sagepub.com/journalsPermissions.nav
 DOI: 10.1177/1933719114549843
 rs.sagepub.com


Abstract

Objective: Endometriosis is linked to altered cell proliferation and stem cell markers c-kit/stem cell factor (SCF) in ectopic endometrium. Our aim was to investigate whether c-kit/SCF also plays a role in eutopic endometrium. **Design:** Eutopic endometrium obtained from 35 women with endometriosis and 25 fertile eumenorrheic women was analyzed for in situ expression of SCF/c-kit, Ki67, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Akt), phosphorylated RAC-alpha serine/threonin-protein kinase (pAkt), Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), and phosphorylated glycogen synthase kinase 3 beta (pGSK3 β), throughout the menstrual cycle. **Results:** Expression of Ki67 and SCF was higher in endometriosis than in control tissue ($P < .05$) and greater in secretory rather than proliferative ($P < .01$) endometrium in endometriosis. Expression of c-kit was also higher in endometriosis although similar in both phases. Expression of Akt and GSK3 β was identical in all samples and cycle phases, whereas pAkt and pGSK3 β , opposed to control tissue, remained overexpressed in the secretory phase in endometriosis. **Conclusion:** Unceasing cell proliferation in the secretory phase of eutopic endometriosis is linked to deregulation of c-kit/SCF-associated signaling pathways.

Keywords

stem cell factor, c-kit receptor, eutopic endometrium, endometriosis, Akt/GSK3 β

Introduction

Endometriosis is a gynecologic pathology characterized by inflammation and invasion of endometrial cells into other tissues. It represents a widespread condition with a relevant impact on women health.¹⁻³ The pathophysiology of the genesis and progression of the disease is unclear and poorly understood. Endometriosis arises from eutopic endometrial cells with increased proliferation and adhesion ability in response to abnormal steroidogenic function, angiogenic factors, cytokines, and others.⁴ In fact it has been demonstrated that augmented cell viability in eutopic endometrium is a consequence of reduction in cell death by apoptosis and an increase in cell proliferation.⁵

Epithelial cells in normal endometrium and ectopic endometrial tissue of endometriotic lesions express stem cell markers oct-4 and c-kit.^{6,7} c-Kit is a proto-oncogene that encodes for a tyrosine kinase receptor,^{8,9} its ligand is the stem cell factor (SCF).¹⁰ Stem cell factor and its receptor have been detected in pregnant endometrium, placental tissues, and in trophoblasts,^{11,12} suggesting a role in growth, proliferation, and differentiation

processes.¹³⁻¹⁵ Stem cell factor has also been found in the peritoneal fluid of patients with endometriosis.¹⁶ c-kit/SCF signal transduction pathway is regulated through Ras/Erk, Src-kinase, or Jak/Stat,¹⁷⁻¹⁹ but interestingly in endometrioid and high-grade serous ovarian carcinomas, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway and GSK3 β have also been clearly identified.^{20,21} Endometriosis is considered a precancerous lesion

¹ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Federal District, Mexico

² Unidad de Endoscopia e Infertilidad, Hospital de la Mujer, Secretaria de Salud, Mexico, Mexico

³ Departamento Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Federal District, Mexico

⁴ Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Español, Mexico, Federal District, Mexico

Corresponding Author:

Marco Cerbón, PhD, Departamento Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., México.

Email: mcerbon85@yahoo.com.mx

associated with ovarian cancer,^{22,23} but strangely the expression and regulation of c-kit/SCF in eutopic endometriosis have not been distinctly examined. Therefore, our aim was to evaluate SCF and c-kit expression and their possible association with the Akt/GSK3 β pathway in human eutopic endometrium biopsies of women with endometriosis.

Materials and Methods

Patients and Tissue Collection

All tissue samples of this case-control study were obtained with the informed consent of the patients. The research ethics committee of the Hospital de la Mujer, Secretaría de Salud, Mexico, Federal District, Mexico (permit id: HMINV-2012-07) approved the study, which was conducted in accordance with international laws on procedures for human tissue handling of Helsinki declaration (1964). The control group consisted of 25 women aged 19 to 40 years old with no endometriosis manifestations who had an endometrial biopsy due to abnormal uterine bleeding, endometrial dating, evaluation of uterine response to hormone therapy (evidence of ovulation), evaluation of long-term amenorrhea, and exclude pelvic diseases. Nevertheless, endometriosis could not be entirely ruled out because laparoscopic visualization of the pelvis was not undertaken in these women. The histopathology analysis of these biopsies confirmed that 13 were in the proliferative phase and 12 in the secretory phase. When in doubt for possible "red lesions," the "suspicious" biopsy samples are routinely subjected to a PGP9.5 immunostain to detect nerve fibers; none of the control group biopsies were positive for this marker. Endometrial tissue specimens were obtained from 35 women, 30 of them were nonsmokers, who underwent laparoscopy for stage III and IV endometriosis classified according to the American Society for Reproductive Medicine.²⁴ The most frequent presenting symptoms were menorrhagia, pelvic pain, or both. Eighty-five percent of the patients underwent laparoscopic evaluation of the pelvis; the remaining patients underwent an ultrasound evaluation. Median age of patients was 37 (range 25-52) years old. The diagnosis was histologically confirmed, but we did not find a relation between the Altman Self-Rating Mania Scale score and the patient's age. The surgical procedures were carried out by an expert gynecological surgeon in the Department of Obstetrics and Gynecology of the Hospital de la Mujer, Mexico City, Mexico, from January 2011 through October 2012. None of the women had received hormonal medication in the 3 months prior to the surgical procedure, and because of the most recent evidence,²⁵ their estrogen and progesterone serum concentrations that are regularly determined by the hospital's routine laboratory were within normal values. Menstrual cycle dating was determined by the clinical history and by histological description according to Noyes criteria.²⁶ Patients and control healthy women were considered to be Mexican Mestizo, and their body mass index of patients and control women was within the 20 to 31 kg/m² units range.

Immunohistochemistry

Endometrial biopsies were fixed in neutral-buffered 4% p-formaldehyde at 4°C overnight and were subsequently paraffin embedded. Before performing immunohistochemistry, sections of the tissues were stained with hematoxylin-eosin to corroborate the clinical diagnosis. Serial sections, 4- μ m thick, were used for immunohistochemistry. Paraffin-embedded sections were dewaxed and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Antigen retrieval was achieved by boiling the samples in 0.01 mol/L citrate of sodium (pH 6) for 20 to 40 minutes. The quenching of endogenous peroxidase was achieved by incubation with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes at room temperature. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the slides were incubated with 2% albumin solution for 2 hours at room temperature and extensively washed with PBS. The slides were incubated at 4°C in a humid chamber overnight with primary antibody diluted in Tris-buffered saline containing 1% bovine serum albumin. Mouse monoclonal antihuman SCF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas) diluted 1:200, mouse monoclonal anti-Ki67 (Biocare Medical, Biocare Medical, Concord, California) diluted 1:100, and a rabbit monoclonal anti-c-kit/CD117 (Biocare Medical, Biocare Medical, Concord, California) diluted 1:50 were used. At the end of the incubation period, the samples were extensively washed in PBS and labeled with an avidin-biotin peroxidase detection system for 2 hours (1:200; VECTASTAIN ABC Elite kit; Vector Laboratories, Inc, Burlington, Vermont) at room temperature. After extensive washing, 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, California) was used as a chromogen. The samples were counterstained with hematoxylin and evaluated with a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, New York). Photographs from 5 different fields per slide were taken randomly. The number and percentage of immunopositive Ki67, SCF, and c-kit positive cells were quantified by image analysis using the NIH Image J software (developed at the U.S. National Institutes of Health, USA superseded by Image J and available on the internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) that transforms the image into an 8-bit image; the program then calculates the intensity of the stained area measuring the amount of pixels/square inch and converts the readings into a white to black numerical value, expressed as optical density (OD). The results so expressed were used for analysis purposes, as described previously.²⁷

Immunofluorescence

Tissue sections prepared identically to that described previously, with the exception of the peroxidase blockage, were incubated at 4°C in a humid chamber overnight with primary antibody diluted in PBS. Rabbit polyclonal, anti-Akt1/2/3 (sc-8312, 1:100), anti-p-Akt1/2/3 (sc-7985-R, 1:100), anti-GSK3 β (sc-9166, 1:100), and anti-p-GSK3 β (sc-11757-R, 1:100), all from Santa Cruz Biotechnology, were used. At the end of the incubation period, the samples were washed thrice in PBS followed by 2 hours incubation with a 1:200 dilution

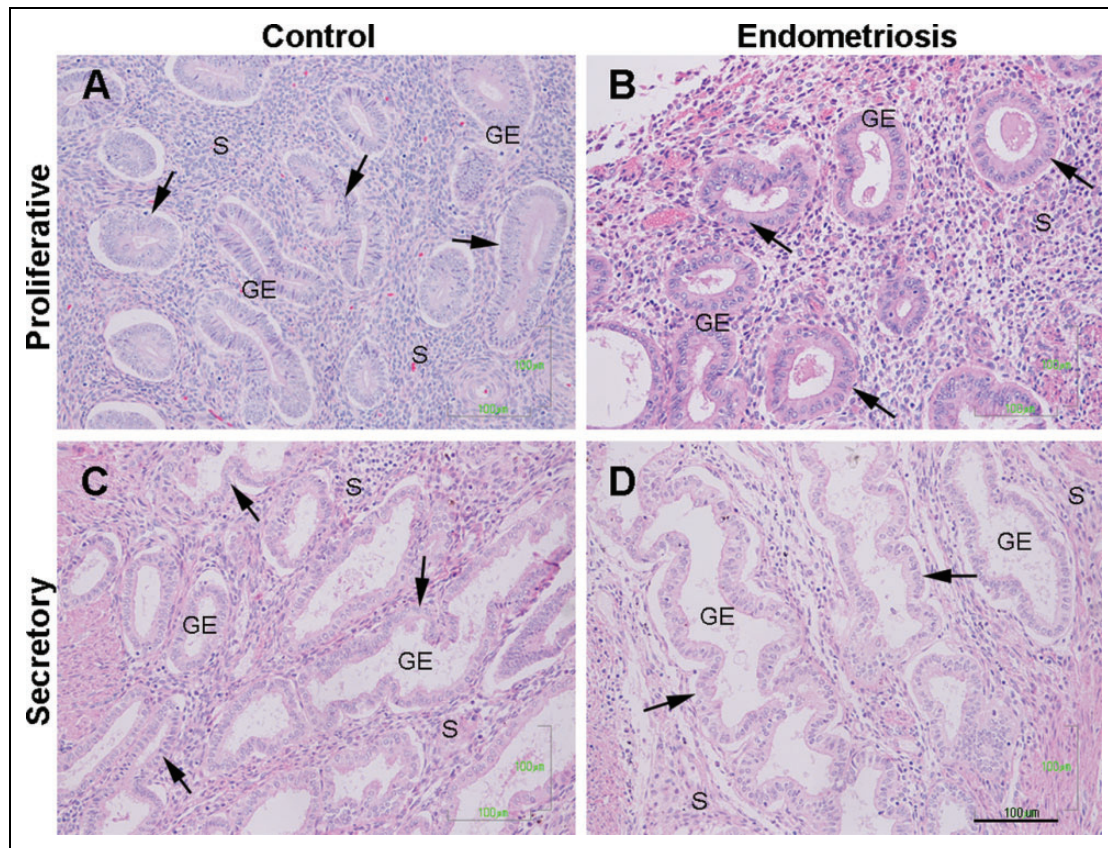


Figure 1. Histological architecture of control and eutopic endometriosis endometrium. Representative image of the histological organization of glandular epithelium (GE) and stroma (S) of normal (A and C) and eutopic endometrium with endometriosis (B and D) in the menstrual cycle phases. Arrows shown typical GE during the proliferative (A and B) and the secretory (C and D) phases, in control and endometriosis endometrium, respectively. Scale bar = 100 μ m. Biopsy samples were hematoxylin–eosin stained.

of the specific goat antirabbit immunoglobulin G-rhodamine-conjugated antibody (Merck Millipore). The samples were counterstained with Hoechst 33342 benzimide (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) according to the manufacturer's instruction. Stained slides were stored at 4°C before being evaluated with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope. Similar to the evaluation performed for the immunohistochemistry analysis, and also in 5 different fields per slide, but using the RGB stack instead of the 8 bits, the intensity of immunopositive cells was evaluated using the Image J software.

Statistical Analysis

Data were examined to determine their normal distribution using the D'Agostino-Pearson normality test included in the software that we use. Once corroborated, the data were analyzed by an analysis of variance test, followed by a post hoc test using the Bonferroni comparisons. All the statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, California). All values are expressed as the mean \pm standard deviation. Differences were considered statistically significant when $P < .05$.

Results

In the proliferative phase of both, case and control samples, columnar surface epithelium, long curving glands, uniform and small stroma cells with round nuclei, and numerous mitotic cells both in the glandular epithelium and stroma were observed. In the secretory phase, the columnar epithelium was cylindrical, the glands exhibited tortuosities and exhibited secretory vacuoles at the apical pole. The stroma showed edematous changes. Because of this, we considered that the eutopic endometrial morphology of control and endometriosis samples were similar in the proliferative as well as in the secretory phases (Figure 1A-D).

Expression of Ki67, SCF, and c-Kit Receptor

A significant increase in the number of Ki67 immunopositive nuclei was observed in the glandular epithelium during the proliferative phase of women with endometriosis. No histological differences were observed in stromal cells of endometriosis and control samples in the same phase (Figure 2A and B). The mean percentage of Ki67 immunopositive cells in the endometriosis samples was $93.84\% \pm 19\%$ versus $62\% \pm 94\%$ in the control group ($P < .01$; Figure 2). Unexpectedly, a highly significant increase in the mean percentage of Ki67 immunopositive cells

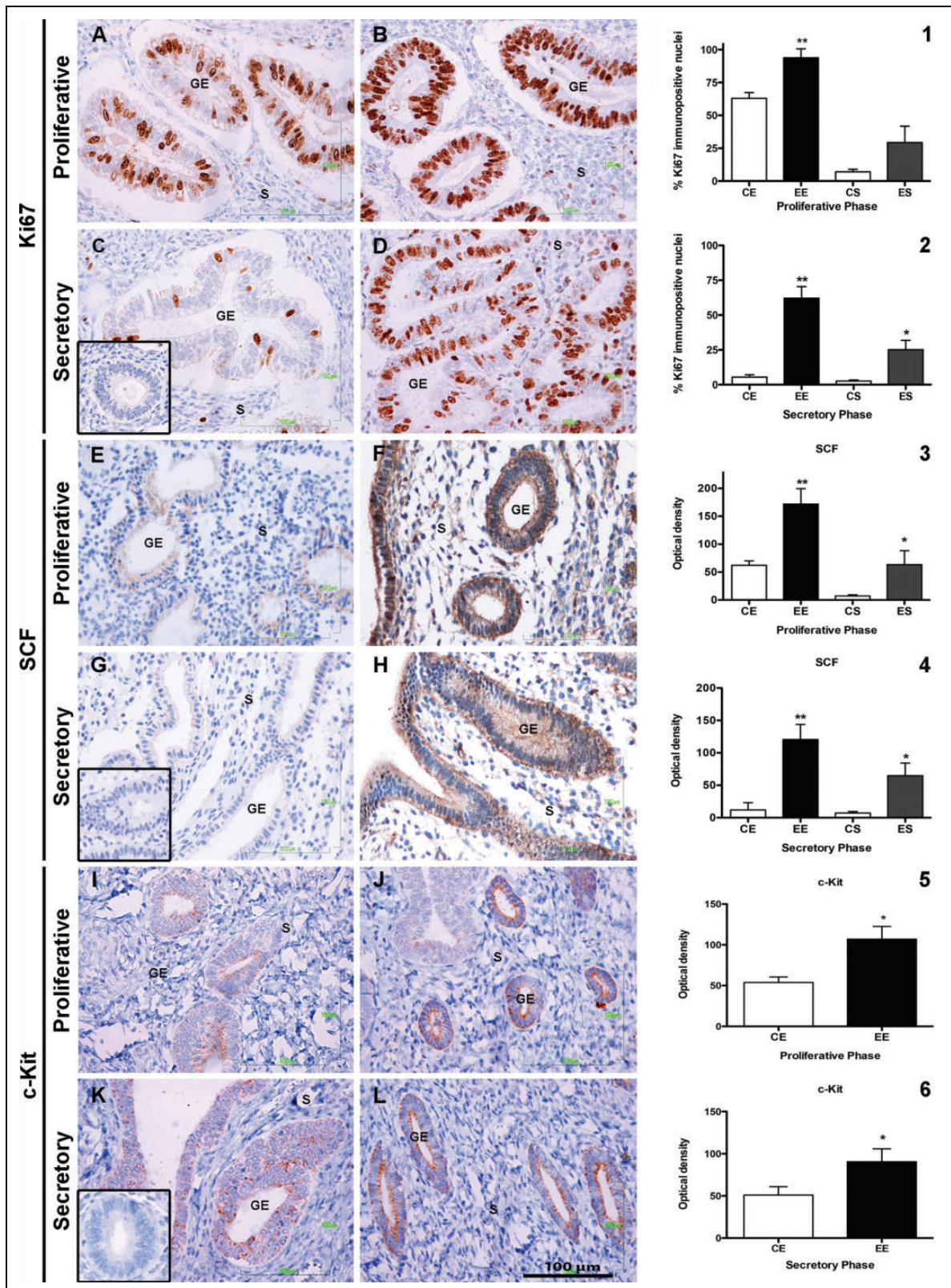


Figure 2. Expression of Ki67, SCF, and c-kit in control and eutopic endometriosis endometrium. Representative image of Ki67 expression in control and eutopic endometriosis is shown in the proliferative phase (A and B, respectively) and in the secretory phase (C and D). The percentage of Ki67 immunopositive nuclei in EE and ES compared to CE and CS is shown in both the proliferative (1) and the secretory phases (2). A representative image of stem cell factor (SCF) expression under identical parameters as those of Ki67 is shown in (E) to (H), the percentage of SCF immunopositive cells in EE and ES compared to CE and CS is shown in both the proliferative (3) and the secretory phases (4).

62.14% \pm 8.27% versus 5.4% \pm 1.64% ($P < .01$) was observed in the glandular epithelium of endometriosis samples during the secretory phase (Figure 2D) in comparison with control samples (Figure 2C); the difference was also observed in the stroma and it was also significant (25.14% \pm 6.76% vs 2.58% \pm 0.8%, $P < .05$; Figure 2).

The expression of SCF in the glandular epithelium and stroma cells of endometriosis samples was also enhanced in the proliferative phase in comparison with control biopsies (Figure 2E and F). The differences were highly significant (171.9 \pm 27.5 OD vs 62.19 \pm 7.91 OD, $P < .01$) for glandular epithelium; differences were also found in relation to stroma SCF expression (63.31 \pm 15.09 OD vs 7.25 \pm 2.09 OD; $P < .05$; Figure 2). It was interesting to observe that in the secretory phase of endometriosis biopsies, highly significant differences were also observed; the noticeable increase in the expression of SCF both in the glandular epithelium (120.6 \pm 23.17 OD vs 11.97 \pm 9.87 OD, $P < .01$) and in the stroma cells (64.82 \pm 19.43 OD vs 7.25 \pm 2.09 OD, $P < .05$; Figure 2G and H) in comparison to control biopsies.

The expression of c-kit receptor was observed only in the glandular epithelium of endometriosis biopsies both in the proliferative and the secretory phases (Figure 2I-L). The differences were statistically significant (93.38 \pm 16.82 vs 53.76 \pm 6.74 OD for the proliferative phase and 90.47 \pm 15.36 vs 51.69 \pm 10.90 OD; $P < .05$) in comparison with the control biopsies. An interesting observation was the occasional presence of c-kit positive cells in the stroma of control biopsies.

Expression of p-Akt and p-GSK3 β

No significant differences in the expression of Akt and GSK3 β were observed in the proliferative or the secretory phases of control and endometriosis biopsies. Nevertheless, there was a significantly increased expression of the phosphorylated Akt (S473) in the proliferative phase of endometriosis biopsies in comparison with the controls ($P < .05$); interestingly, this overexpression remained increased in the secretory phase of endometriosis biopsies, whereas, as expected, the control biopsies showed a nearly 50% reduction in pAkt expression; the differences were highly significant (Figure 3; $P < .01$). An identical behavior with the same statistical differences was observed when pGSK3 β (S9) expression was evaluated (Figure 4).

Discussion

Endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by increased cellular proliferation, adhesion, and invasion of

tissue similar to uterine endometrium in the eutopic endometrium²⁸ and places other than those physiologically appropriate.

Our results did not show evidence of histological differences between endometriosis eutopic endometrium and control biopsies. This suggests that in patients with endometriosis, the relative concentration of steroid hormones is not altered, but it does not rule out the firm concept that it is an estrogen-dependent pathology with progesterone resistance due to low progesterone-receptor levels.²⁹⁻³¹ In fact it appears that the regulation of the different subtypes of estrogen receptor and progesterone receptor isoforms mediates distinct responses to steroid hormones and differs between normal and eutopic endometria,³² although the most recent evidence shows that the elevated endometrial concentrations of estrone and estradiol in endometriotic tissue are determined by local metabolism rather than circulating levels.²⁵

The proliferation of epithelial and stromal cells in endometriosis biopsies was increased in the proliferative phase, as determined by the cell cycle marker Ki67, but it was unexpectedly higher in the secretory phase of endometriosis biopsies. Our results are in accordance with those of Mourtzikou et al,³³ for control biopsies, but not as far as endometriosis is concerned. Expression of Ki67 is dependent on estrogens and is also linked to SCF/c-kit in other tissues and some cancers.^{34,35} Increased cell proliferation has been related to a reduction in cell death and an increase in cell proliferation due to abundance of c-myc,⁵ although a differential regulation of micro-RNAs in the secretory and proliferative phase of the cycle, which is under hormonal control,³⁶ has also been considered.

It has been suggested that different stem cell populations contribute to endometriosis pathogenesis.³⁷ Stem cell factor and its receptor c-kit regulate the differentiation, proliferation, and survival of stem/pluripotent cells in normal endometrium and play an important role in follicular development.³⁸ The expression of SCF increases in the proliferative phase and diminishes in the secretory phase¹¹ of normal endometrial phases. An interesting although relatively uncommon result was that some of the biopsies of the women with and without endometriosis showed occasional c-kit+ cells in the stroma, which seem to belong to some kind of undifferentiated mesenchymal stromal cells that require c-kit for maintenance.³⁹ These cells are possibly those considered as human endometrial side population cells that correspond to somatic stem cells and express c-kit⁴⁰; they can be found in stromal or epithelial endometrial compartments, but these clonogenic epithelial cells are weakly supported by SCF, especially those found in the stroma.⁴¹ We could not establish a relation between the number of these putative stem cells and the

Figure 2. (Continued) The expression of c-kit is shown in (I) to (L). The percentage of c-kit immunopositive cells in CE and EE is shown in both the proliferative (5) and the secretory phases (6). An isotype match IgG stain was used as negative control for each of the antibodies used, and the result is shown in the inset in the low left side of the (C), (G), and (K) images. The S and GE within each figure mark the stroma and the glandular epithelium. Magnification $\times 400$, scale bar = 100 μm . The histograms in the right side of the images represent the mean \pm standard deviation of the values obtained for the endometrial biopsy samples of all the endometriosis ($n = 35$) and the control ($n = 25$) groups for each immunostain in the proliferative or the secretory phases. * $P < .05$ and ** $P < .01$. CE indicates control epithelium; EE, endometriosis epithelium; CS, control stroma; ES, endometriosis stroma; IgG, immunoglobulin G.

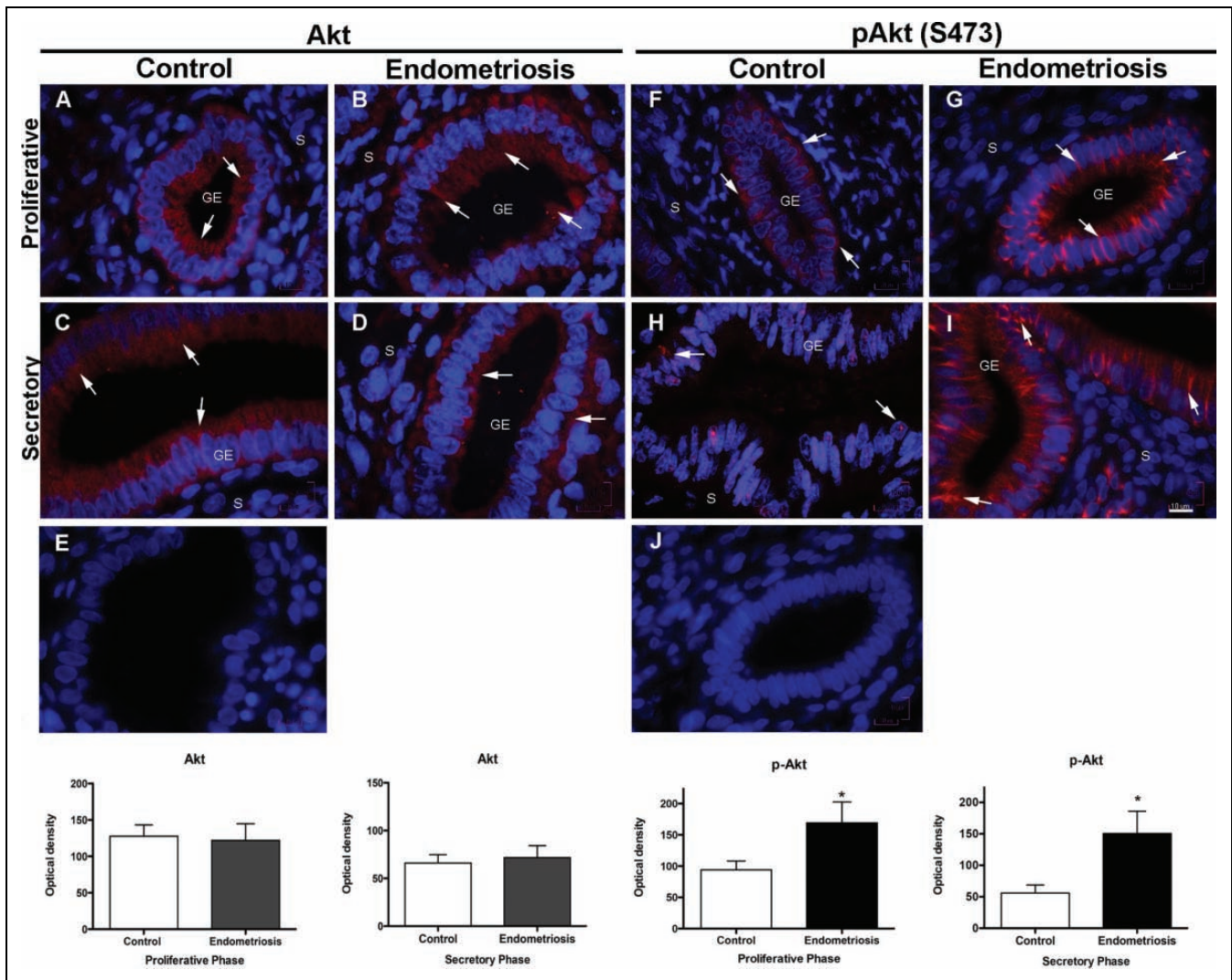


Figure 3. Expression of Akt and pAkt (S473) in control and eutopic endometriosis endometrium. Representative images of Akt and pAkt (S473) expression in the proliferative phase of control endometrium (A and F) and eutopic endometriosis (B and G) endometrium. C and H, Akt and pAkt (S473) expression during the secretory phase in the control endometrium and (D and I) in eutopic endometriosis with endometriosis. E and J, An isotype match immunoglobulin G stain used as negative control for each of the antibodies. Arrows show the Akt and pAkt (S473) localization mainly in the glandular epithelia. Magnification $\times 1000$, scale bar = 10 μm . The histograms represent the mean \pm standard deviation of all the values obtained for the endometrial biopsy samples of the endometriosis ($n = 35$) and the control ($n = 25$) groups for each immunostain in the proliferative or the secretory phases. * $P < .05$. GE indicates glandular epithelium; S, stroma.

degree of endometriosis; but nevertheless, it is possible that these cells that regulate the effect of growth factors on proliferation and differentiation of endometrial cells³⁹ have a central role in endometriosis. Schwab et al⁴² have shown that clonogenicity does not vary from the proliferative to the secretory stage of the menstrual cycle or between active cycling and inactive endometrium for both epithelial and stromal cells. Thus, suggesting a complex regulation of these putative stem cells in the endometrium⁴² possible dependent on local production of hormones and growth factors.

Our results showed that SCF expression was significantly increased in the glandular epithelium and stromal cells, whereas its c-kit receptor was only increased in the glandular epithelium, both in the proliferative and the secretory phases

of women with endometriosis. Temporal changes in SCF and c-kit receptor expression during the normal menstrual cycle¹¹ and in benign endometrial tissues⁴³ have been reported, suggesting their possible involvement in endometrial function. Nevertheless, c-kit expression is controversial since its expression in the endometrium of women with endometriosis does not seem to differ from women without endometriosis.⁴⁴

Our results showed an important increase in pAkt and pGSK3 β expression in the glandular epithelium during the proliferative and secretory phases of endometriosis. The SCF/c-kit interaction is involved in many cellular functions such as survival, proliferation, and apoptosis through the PI3K/Akt pathway⁴⁵ and GSK3 β , a key regulatory kinase that participates in numerous signaling pathways. This signaling pathway

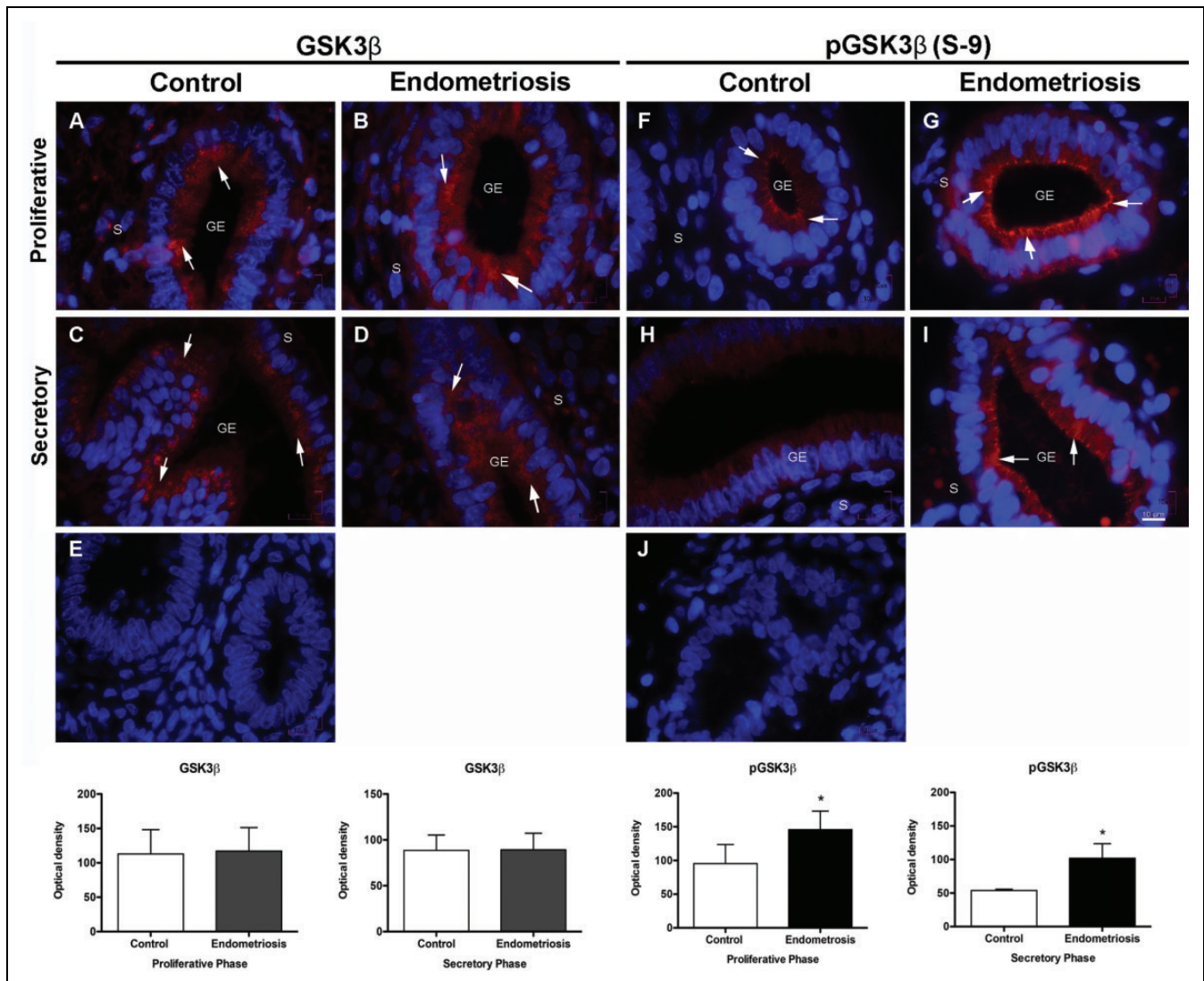


Figure 4. Expression of GSK3 β and pGSK3 β (S9) in control and eutopic endometriosis endometrium. Representative images of GSK3 β and pGSK3 β (S9) expression in the proliferative phase of control endometrium (A and F), and eutopic endometriosis (B and G) endometrium. C and H, GSK3 β and pGSK3 β (S9) expression during the secretory phase in the control endometrium and (D and I) in eutopic endometriosis with endometriosis. Arrows show GSK3 β and pGSK3 β (S9) localization. E and J, An isotype match immunoglobulin G stain used as negative control for each of the antibodies. Magnification $\times 1000$, scale bar = 10 μm . The histograms represent the mean \pm standard deviation of all the values obtained for the endometrial biopsy samples of the endometriosis (n = 35) and the control (n = 25) groups for each immunostain in the proliferative or the secretory phases. *P < .05. GE indicates glandular epithelium; S, stroma.

participates in epithelial proliferation in uterine endometrium.^{46,47} Akt increases endometrial cell survival, and β -estradiol-induced Akt phosphorylation of stromal cells may be involved in altered apoptosis/proliferation regulation in endometriosis.⁴⁸ This suggests that SCF/c-kit could promote epithelial cell proliferation and survival through Akt/GSK3 β signaling, not only in the proliferative but also in the secretory phase of endometriosis. GSK3 β is constitutively active, and its activity is negatively regulated primarily through Ser9 phosphorylation^{49,50} followed by Tyr216 phosphorylation both of which are mediated by Akt.⁵¹ We showed that Akt and GSK3 β remained phosphorylated during the secretory phase in endometriosis biopsies. Phosphorylation of Akt upregulates the

expression of cell survival genes and downregulates apoptosis.⁵² Our results confirm the observations made by Silveira et al⁵³ but might be considered puzzling since progesterone inhibits the AKT/GSK3 β pathway related to epithelial proliferation⁵⁴ but GSK3 β maintains progesterone receptor A stability.⁵⁵ Our results reinforce the importance of the PI3K/Akt pathway in endometriosis but contrary to the results of Cinar et al,⁴⁸ we showed that the sustained pAkt expression in both phases of the cycle, especially in the secretory phase, is non-estradiol dependent, thus advocating Akt as a major participant in the pathogenesis of endometriosis. The overall results of our work indicate that there is an increased expression of SCF/C-kit and an impaired signaling by the

perpetuation of Akt and GSK3 β phosphorylation in eutopic endometriosis that might maintain epithelial cell proliferation in the secretory phase of the menstrual cycle. We acknowledge that our results are solely based on immunohistochemistry stain data and although functional experiments, such as the therapeutic inhibition of Akt,⁵⁶ would be welcomed, so far they are not being considered in endometriosis.

Acknowledgments

The authors thank Raquel Guerrero Alquicira for excellent technical assistance.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: Yanira Franco Murillo is a recipient of a doctoral fellowship from CONACyT and the Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico, Federal District, Mexico.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012;39(4):535-549.
- Acien P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol.* 2013;2013:242149.
- Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(8):859-862.
- Liu H, Lang JH. Is abnormal eutopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit.* 2011;17(4):RA92-RA99.
- Johnson MC, Torres M, Alves A, et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:45.
- Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, Moscarini M. Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril.* 2011;95(3):1171-1173.
- Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H, Kim SK. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril.* 2004;81(2):403-407.
- Roskoski R Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(1):1-13.
- Sharkey AM, Jokhi PP, King A, Loke YW, Brown KD, Smith SK. Expression of c-kit and kit ligand at the human maternofetal interface. *Cytokine.* 1994;6(2):195-205.
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6(11):3341-3351.
- Kauma S, Huff T, Krystal G, Ryan J, Takacs P, Turner T. The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):1261-1266.
- Saito S, Enomoto M, Sakakura S, Ishii Y, Sudo T, Ichijo M. Localization of stem cell factor (SCF) and c-kit mRNA in human placental tissue and biological effects of SCF on DNA synthesis in primary cultured cytotrophoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(3):1762-1769.
- Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(5-6):961-972.
- Lennartsson J, Ronnstrand L. The stem cell factor receptor/c-kit as a drug target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006;6(1):65-75.
- Ulivi P, Zoli W, Medri L, et al. c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;83(1):33-42.
- Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, et al. Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44(4):231-235.
- Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The c-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(5):435-443.
- Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, et al. Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt pathway. *Dig Dis Sci.* 2007;52(9):2292-2300.
- Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 2004;23(48):8017-8023.
- Wu R, Hu TC, Rehemtulla A, Fearon ER, Cho KR. Preclinical testing of PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitors in a mouse model of ovarian endometroid adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(23):7359-7372.
- Espinosa I, Catusus L, Canet B, D'Ángelo E, Muñoz J, Prat J. Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol* 2011;24(6):846-854.
- Lai CR, Hsu CY, Chen YJ, Yen MS, Chao KC, Li AF. Ovarian cancers arising from endometriosis: a microenvironmental biomarker study including ER, HNF1ss, p53, PTEN, BAF250a, and COX-2. *J Chin Med Assoc.* 2013;76(11):629-634.
- Siufi Neto J, Kho RM, Dos Santos Siufi DF, Baracat EC, Anderson KS, Abrao MS. Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *J Minim Invasive Gynecol.* 2014;21(1):55-63.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997;67(5):817-821.
- Huhtinen K, Desai R, Stahle M, et al. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):4228-4235.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975;122(2):262-263.
- Mendoza-Rodriguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, et al. c-fos and estrogen receptor gene expression pattern

- in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev.* 2003;64(4):379-388.
28. Delbandi AA, Mahmoudi M, Shervin A, et al. Eutopic and ectopic stromal cells from patients with endometriosis exhibit differential invasive, adhesive, and proliferative behavior. *Fertil Steril.* 2013;100(3):761-769.
 29. Al-Sabbagh M, Lam EW, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;358(2):208-215.
 30. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2897-2902.
 31. Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev.* 2013;34(1):130-162.
 32. Shao R, Cao S, Wang X, Feng Y, Billig H. The elusive and controversial roles of estrogen and progesterone receptors in human endometriosis. *Am J Transl Res.* 2014;6(2):104-113.
 33. Mourtzikou A, Kosmas K, Marouga A, Stamouli M, Pouliakis A, Karakitsos P. The use of an immunocytochemical double-labeling staining can display the distribution of Bcl-2/Ki-67 cells in endometrial adenocarcinomas as well as in normal endometrium. *Clin Lab.* 2012;58(1-2):133-144.
 34. Li W, Jia M, Qin X, Hu J, Zhang X, Zhou G. Harmful effect of ERbeta on BCRP-mediated drug resistance and cell proliferation in ERa/PR-negative breast cancer. *FEBS J.* 2013;280(23):6128-6140.
 35. Krasagakis K, Kruger-Krasagakis S, Eberle J, Tsatsakis A, Tosca AD, Stathopoulos EN. Co-expression of KIT receptor and its ligand stem cell factor in Merkel cell carcinoma. *Dermatology.* 2009;218(1):37-43.
 36. Belleudi F, Cardinali G, Kovacs D, Picardo M, Torrisi MR. KGF promotes paracrine activation of the SCF/c-KIT Axis from human keratinocytes to melanoma cells. *Transl Oncol.* 2010;3(2):80-90.
 37. Forte A, Cipollaro M, Galderisi U. Genetic, epigenetic and stem cell alterations in endometriosis: new insights and potential therapeutic perspectives. *Clin Sci.* 2014;126(2):123-138.
 38. Oliveira FR, Dela Cruz C, Del Puerto HL, Vilamil QT, Reis FM, Camargos AF. Stem cells: are they the answer to the puzzling etiology of endometriosis? *Histol Histopathol.* 2012;27(1):23-29.
 39. Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y. A role for c-kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials.* 2014;35(11):3618-3626.
 40. Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, et al. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One.* 2010;5(6):e10964.
 41. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod.* 2004;70(6):1738-1750.
 42. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2005;84(suppl 2):1124-1130.
 43. Mitsunari M, Harada T, Tanikawa M, Iwabe T, Taniguchi F, Terakawa N. The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(9):874-879.
 44. Elmore LW, Domson K, Moore JR, Kornstein M, Burks RT. Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(1):146-151.
 45. Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Darai E. Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. *J Reprod Immunol.* 2005;65(1):55-63.
 46. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;11(3):297-305.
 47. Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y. Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod.* 2006;21(5):1122-1128.
 48. Cinar O, Seval Y, Uz YH, et al. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(6):864-871.
 49. Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase → AKT → GSK-3beta → cyclin D1 → pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2005;19(8):1978-1990.
 50. Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(15):1930-1944.
 51. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001;65(4):391-426.
 52. Kockeritz L, Doble B, Patel S, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3—an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets.* 2006;7(11):1377-1388.
 53. Silveira CG, Abrao MS, Dias JA Jr, et al. Common chromosomal imbalances and stemness-related protein expression markers in endometriotic lesions from different anatomical sites: the potential role of stem cells. *Hum Reprod.* 2012;27(11):3187-3197.
 54. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Pouly JL, Mage G. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3180-3187.
 55. Wang S, Li Y, Hsu PH, Lee SY, Kim Y, Lee EY. Progesterone receptor A stability is mediated by glycogen synthase kinase-3b in the Brca-1 deficient mammary gland. *J Biol Chem.* 2013;288(36):26265-26274.
 56. Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem.* 2008;51(18):5522-5532.